



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS**

**CONTRIBUIÇÃO DOS RECEPTORES DE GRELINA DOS NEURÔNIOS PRÉ-
MOTORES SIMPÁTICOS DO HIPOTÁLAMO PARAVENTRICULAR PARA O
CONTROLE DA FUNÇÃO CARDIOVASCULAR**

JOICE SIMÕES SANTANA

**GOIÂNIA-GO
2018**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o(a) autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

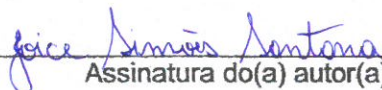
Nome completo do(a) autor(a): Joice Simões Santana

Título do trabalho: Contribuição dos receptores de grelina dos neurônios pré-motores simpáticos do hipotálamo paraventricular para o controle da função cardiovascular

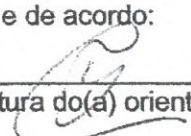
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ **SIM** ☐ **NÃO¹**

Independente da concordância com a disponibilização eletrônica é imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 04 / 05 / 2020

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² As assinaturas devem ser originais sendo assinadas no próprio documento. Imagens coladas não serão aceitas.

JOICE SIMÕES SANTANA

**CONTRIBUIÇÃO DOS RECEPTORES DE GRELINA DOS NEURÔNIOS PRÉ-
MOTORES SIMPÁTICOS DO HIPOTÁLAMO PARAVENTRICULAR PARA O
CONTROLE DA FUNÇÃO CARDIOVASCULAR**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Farmacologia e Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo Nassar Ferreira

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Xavier Custódio

Santana, Joice Simões

Contribuição dos receptores de grelina dos neurônios pré-motores simpáticos do hipotálamo paraventricular para o controle da função cardiovascular. / Joice Simões Santana.
-- Goiânia, 2018.

92 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

Título em Inglês: *Contribution of ghrelin receptors from sympathetic premotor neurons of paraventricular hypothalamus to the control of cardiovascular function.*

1. Hipotálamo paraventricular. 2. Função cardíaca. 3. Grelina. 4. Sistema nervoso autônomo



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

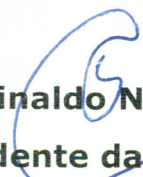
ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Nº 10

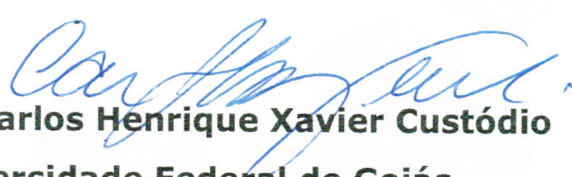
Aos nove dias do mês de maio do ano de dois mil e dezoito, às nove horas, no Anfiteatro do Instituto de Ciências Biológicas I da Universidade Federal de Goiás, reuniram-se os componentes da banca examinadora: Prof. Dr. Reginaldo Nassar Ferreira, Prof. Dr. Carlos Henrique Xavier Custódio, Profa. Dra. Patrícia Maria Ferreira e Prof. Dr. Diego Basile Colugnati para, em sessão pública presidida pelo primeiro examinador citado, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada "CONTRIBUIÇÃO DOS RECEPTORES DE GRELINA DOS NEURÔNIOS PRÉ-MOTORES SIMPÁTICOS DO HIPOTÁLAMO PARAVENTRICULAR PARA O CONTROLE DA FUNÇÃO CARDIOVASCULAR", em nível de mestrado, de autoria de **Joice Simões Santana**, discente do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo presidente, que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra, a seguir, foi concedida à autora da dissertação que, em cerca de 40 minutos, procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu a examinada, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da dissertação. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº1558 de 2017 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, a dissertação foi aprovada, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega da versão definitiva da dissertação na secretaria do programa, com as devidas correções sugeridas pela banca examinadora, no prazo de trinta dias a contar da data da



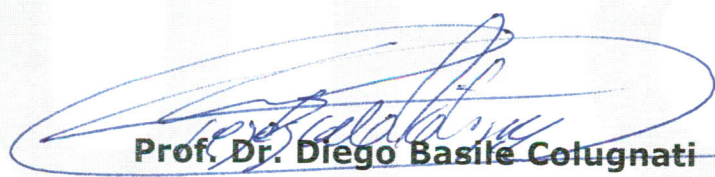
SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

defesa. Cumpridas as formalidades de pauta, às 11:40 horas e
40 minutos, encerrou-se a sessão de defesa e, para constar, eu, Renato
César Rodrigues, Assistente em Administração da Universidade Federal de
Goiás, lavrei a presente ata que, após lida e aprovada, será assinada por seus
membros em três vias de igual teor.


Prof. Dr. Reginaldo Nassar Ferreira
Presidente da Banca
Universidade Federal de Goiás


Prof. Dr. Carlos Henrique Xavier Custódio
Universidade Federal de Goiás


Profa. Dra. Patrícia Maria Ferreira
Universidade Federal de Goiás


Prof. Dr. Diego Basile Colugnati
Universidade Federal de Goiás

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da UFG, sob o número 090/15, e recebeu suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Dedicatória

Dedico esse trabalho a todos que se irmanam na terra, passando por caminhos doces e ásperos, na grande corrente da vida. A todos que se esforçam para desvendar e compreender os seus mistérios. Ao movimento positivo de todos os incomodados.

Agradecimentos

À Deus, por me reservar tantas oportunidades de aprendizado e de superação nessa caminhada, e em todos os momentos e de tantas formas, por cuidar de mim. Obrigada, meu Deus, por seu amor, generosidade e sabedoria infinitos.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Reginaldo Nassar Ferreira e Prof. Dr. Carlos Henrique Xavier Custódio por me abrirem as portas do mestrado, confiarem a mim esse importante projeto e me conduzirem pela formação científica. Obrigada pela oportunidade, pelos ensinamentos, pela confiança e pela paciência.

Aos meus pais, Célia Simões e Wellington Moraes Santana, pelo amor, sacrifício e dedicação ilimitados, que constituem a base sólida sobre a qual eu me apoiei e apoio para alcançar esse e todos os outros sonhos. Mãe, obrigada por ser o meu esteio, a minha referência e o meu maior exemplo.

Aos meus irmãos Jéssica Simões Santana Batista, Renato Simões Santana e Vitória Bequiman Santana, pela torcida e apoio. Jéssica, obrigada pela Cecília, e por estar comigo desde o princípio, e sempre!

Às minhas avós, Maria Aparecida Laforga Simões e Maria Luísa Santana, queridas amigas e professoras de todos os dias, pela sabedoria com que vivem a vida e ensinam pelo exemplo.

Ao meu namorado Murilo Mendes Teixeira, pelo companheirismo e cuidado com que atravessou comigo os desafios enfrentados. Meu bem, obrigada pelo carinho, pela fortaleza, pela confiança imperturbável e pelo encorajamento, nos dias fáceis e difíceis, desde que chegou. Como é bom poder contar com você!

À Universidade Federal de Goiás e ao Instituto de Ciências Biológicas, por me permitir galgar mais um degrau na minha formação. Ao empenho de todos os seus professores e funcionários no decorrer desse processo.

Ao professor Carlos Henrique Xavier e a colega Michelle Mendanha Mendonça, pela ajuda extremada na execução dos experimentos, análise dos resultados e elaboração do artigo científico.

Ao Laboratório de Fisiologia e Terapêutica Cardiovascular, por fornecer todo o necessário para a execução desse trabalho e muito mais. Aos colegas Kellen Rosa da Cruz, Gabriel Camargo da Silva, Larissa Córdova Turones, Carolina Nobre, Michelle Mendanha Mendonça, Maria Simone Jerônimo Pereira, Natália Alves da Costa, Elder Sales da Silva, Dryelle Reis e Daniel Graziani, pela amizade, pelo apoio e pelo aprendizado valioso em tantos momentos compartilhados.

À estimada Profa. Patrícia Maria Ferreira, pela intercessão e apoio imensurável nos momentos difíceis.

Aos professores: Carlos Henrique de Castro, André Freiria Oliveira, Paulo Ghedini, Renata Mazzaro, Diego Colugnati, Aline Pansani, Elson Alves Costa, Mauro

Xavier Pinto, Onésia Cristina Lima, Roger Pobbe e Rodrigo Mello Gomes pelos ensinamentos e pela inspiração.

Aos professores, colegas e amigos da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por me apresentarem o seu conhecimento, as suas pesquisas, os seus laboratórios, e tão bem me receberem. Em especial à professora Rita Tostes, ao professor Leonardo Resstel, ao professor Norberto Cairasco, à pesquisadora Cristiane Busnardo e aos amigos Gentil Ferreira Gonçalves Neto, Gleice Kelli Cardoso e Pedro Henrique Felix Silva.

Aos animais utilizados, que não puderam escolher ou compreender a causa, mas que nobremente deram vida a esse conhecimento.

Ao esforço de todos os brasileiros para que a ciência se faça no nosso país, porque acreditamos na melhoria e na transformação.

Aos órgãos de fomento FAPESP, CAPES e CNPq, pelo auxílio financeiro essencial à realização desse trabalho.

As amigas de todas as horas Karine Louise Calaça e Manuella Cabral, que acompanharam todo esse trabalho, me alegrando, me ouvindo e me amparando sempre.

As queridas Larissa Córdova Turones, Maria Simone Pereira Jerônimo, Kellen Rosa da Cruz, Carolina Nobre e Natália Alves da Costa, por todo carinho, apoio e pelas inúmeras vivências compartilhadas, que transcendem o âmbito acadêmico e reverberam para toda a minha vida. Vocês são flores que perfumaram e embelezaram esse caminho, tornando-o possível e inesquecível. As levo no coração.

À todas as outras pessoas, lugares e acontecimentos que contribuíram a sua maneira para o aprendizado acadêmico e pessoal que conquistei ao longo dessa caminhada. Foi tudo muito valioso.

Muito obrigada a todos!

“Não acredite em algo simplesmente porque ouviu. Não acredite em algo simplesmente porque todos falam a respeito. Não acredite em algo simplesmente porque está escrito em seus livros religiosos. Não acredite em algo só porque seus professores e mestres dizem que é verdade. Não acredite em tradições só porque foram passadas de geração em geração. Mas depois de muita análise e observação, se você vê que algo concorda com a razão, e que conduz ao bem e benefício de todos, aceite-o e viva-o.”

Buda

“Nem tudo o que pode ser contado conta, e nem tudo o que conta pode ser contado”
Albert Einstein

“Tenho-vos dito isso, para que em mim tenhais paz; no mundo tereis aflições, mas tende bom ânimo; eu venci o mundo”

João 16.33

SUMÁRIO

Dedicatória	vii
Agradecimentos	viii
SUMÁRIO	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE TABELAS	xvi
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Regulação autonômica da função cardiovascular	1
1.2 O hipotálamo paraventricular e seu papel controlador do SNA	3
1.3 Sinapses gabaérgicas que atuam sobre o PVH	5
1.4 O hormônio Grelina	7
2 OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo Geral	11
2.2 Objetivos Específicos	11
3 METODOLOGIA	12
3.1 Drogas	12
3.2 Animais	12
3.3 Procedimentos cirúrgicos	12
3.3.1 Traqueostomia	12
3.3.2 Canulação de artéria e veia femorais	13
3.3.3 Cateterização do ventrículo esquerdo cardíaco	13
3.3.4 Craniotomia e localização do hipotálamo paraventricular	14
3.4 Grupos experimentais	14
3.5 Análise Histológica	15
3.6 Aquisição e Análise Estatística dos Dados	16
4 RESULTADOS	17
4.1 Respostas cardíacas produzidas pela injeção de grelina no PVH	17
4.2 Respostas cardíacas produzidas pelo antagonismo dos receptores GHS-R1a (injeção de PF04628935) no PVH	20

4.3	Respostas cardíacas produzidas pela grelina após a estimulação dos receptores GABA _A no PVH	23
4.4	Sumarização dos Resultados	27
5	DISCUSSÃO	28
6	CONCLUSÃO	33
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
8	ANEXOS	49
8.1	Anexo I: CONTROL OF CARDIAC FUNCTION BY GHRELIN IN THE PARAVENTRICULAR HYPOTHALAMUS. <i>Brazilian Journal of Medical and Biological Research. Submitted</i>	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μm	Micrômetro
bpm	Batimentos por minuto
dP/dT	Derivada pressão/derivada tempo
FC	Frequência cardíaca
g	Gramma
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GHS-R1a	Receptor secretagogo do hormônio do crescimento subtipo 1A
HPA	Eixo Hipotálamo – Hipófise (pituitária) - Adrenal
i.p.	Intraperitoneal
IML	Medula intermédia lateral
IV	Intravenoso
Kg	Quilograma
LVP	Pressão arterial intraventricular esquerda
máx	Máximo
min	Minuto
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mmHg	Milímetros de mercúrio
mRNA	RNA mensageiro
NaCl	Cloreto de sódio
nL	Nanolitro
PA	Pressão arterial
PAM	Pressão arterial média
PVH	Hipotálamo paraventricular
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
RVLM	Região rostroventrolateral do bulbo
SC	Subcutânea
SCV	Sistema cardiovascular
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNAS	Sistema nervoso autônomo simpático
SNC	Sistema nervoso central

UFG

Universidade Federal de Goiás

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1</i>	5
<i>Figura 2</i>	9
<i>Figura 3</i>	14
<i>Figura 4</i>	17
<i>Figura 5</i>	18
<i>Figura 6</i>	19
<i>Figura 7</i>	20
<i>Figura 8</i>	21
<i>Figura 9</i>	22
<i>Figura 10</i>	23
<i>Figura 11</i>	24
<i>Figura 12</i>	25
<i>Figura 13</i>	26

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1</i>	27
-----------------------	----

RESUMO

A ação neuroquímica sobre o hipotálamo paraventricular (PVH), cuja atividade depende do equilíbrio das sinapses excitatórias e inibitórias, como as gabaérgicas, é responsável pela modulação do sistema cardiovascular. Os efeitos da grelina, um peptídeo de 28 aminoácidos, são mediados pelo subtipo 1a do receptor secretagogo do hormônio do crescimento (GHS-R1a), densamente expresso nos neurônios pré-motores simpáticos do PVH. Logo, este trabalho investigou os efeitos da grelina sobre o controle exercido pelo PVH sobre a função cardiovascular e sua relação com a atividade gabaérgica. Para tanto, a pressão arterial sistêmica média (PAM) em artéria femoral e a pressão no ventrículo cardíaco esquerdo (LVP) de ratos Wistar (250-300 g) foram mensuradas por cateterismo. O tratamento com 100 nL de grelina 0,03 nM injetados diretamente no PVH reduziu a PAM em 40 ± 12 mmHg e o valor máximo da pressão arterial no ventrículo cardíaco esquerdo ($LVP_{máx}$) em 28 ± 12 mmHg, bem como sua derivada em função do tempo ($LVdP/dT_{máx}$), uma medida do inotropismo, que foi reduzida em 2051 ± 946 mmHg/s, sem provocar alterações estatisticamente significativas no cronotropismo cardíaco. Em contraste, para demonstrar que os efeitos da grelina foram mediados por GHS-R1a, a inibição deste com 100 nL de PF04628935 (0,06 nM) no PVH provocou aumento da PAM em 8 ± 3 mmHg e da $LVP_{máx}$ em 29 ± 8 mmHg; além de estimular o inotropismo, com $LVdP/dT_{máx}$ sendo elevado em 1449 ± 467 mmHg/s, e o cronotropismo, com frequência cardíaca elevada em 29 ± 12 bpm. Por fim, a comparação de seus efeitos com muscimol, um agonista do receptor $GABA_A$, demonstrou que grelina potencializou a redução da pressão arterial induzida por aquele fármaco, reduzindo a PAM em 19 ± 5 mmHg, sem alterar significativamente a pressão no ventrículo esquerdo cardíaco e o inotropismo. Curiosamente, grelina promoveu elevação da frequência cardíaca em 27 ± 12 bpm, pós injeção de muscimol. O presente trabalho demonstrou que o eixo grelina – GHS-R1a no PVH contribui para o controle cardiovascular e relacionou estes efeitos a interações com o sistema gabaérgico.

Palavras-chave: Hipotálamo paraventricular, função cardíaca, grelina, sistema nervoso autônomo

ABSTRACT

The neurochemical action on the paraventricular hypothalamus (PVH), whose activity depends on the balance of the excitatory and inhibitory synapses, such as gabaergic ones, is responsible for cardiovascular system modulation. The effects of ghrelin, a 28-amino acids peptide, are mediated by subtype 1a of the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R1a), densely expressed in the sympathetic pre-motor neurons of PVH. Therefore, this work investigated the effects of ghrelin on the control exercised by PVH on cardiovascular system and its relationship with gabaergic activity. For this purpose, mean systemic arterial pressure (PAM) in the femoral artery and pressure in the left cardiac ventricle (LVP) of Wistar rats (250-300 g) were measured by catheterization. Treatment with 100 nL of 0.03 nM ghrelin injected directly into PVH reduced PAM by 40 ± 12 mmHg and the maximum blood pressure in the left cardiac ventricle (LVP_{max}) by 28 ± 12 mmHg, as well as its derivative as a function of time ($LVdP / dT_{max}$), a measure of inotropism, which was reduced by 2051 ± 946 mmHg / s, without causing statistically significant changes in cardiac chronotropism. In contrast, to demonstrate that the effects of ghrelin were mediated by GHS-R1a, the inhibition of this receptor with 100 nL of PF04628935 (0.06 nM) in PVH caused an increase in PAM of 8 ± 3 mmHg and of LVP_{max} by 29 ± 8 mmHg; in addition to stimulating inotropism, with $LVdP / dT_{max}$ being elevated at 1449 ± 467 mmHg / s, and chronotropism, with elevated heart rate at 29 ± 12 bpm. Finally, the comparison of its effects with muscimol, a GABA_A receptor agonist, demonstrated that ghrelin potentiated the reduction in blood pressure induced by that drug, reducing PAM by 19 ± 5 mmHg, without significantly altering the pressure in the cardiac left ventricle and inotropism. Interestingly, ghrelin promoted an increase in heart rate by 27 ± 12 bpm, after muscimol injection. The present study demonstrated that the ghrelin axis - GHS-R1a in PVH contributes to cardiovascular control and related these effects to interactions with the gabaergic system.

Keywords: Paraventricular hypothalamus, cardiac function, ghrelin, autonomic nervous system.

1 INTRODUÇÃO

O controle da função de órgãos, vasos sanguíneos e glândulas é uma atribuição da divisão visceral do sistema nervoso, através dos eixos simpático e parassimpático que compõem o sistema nervoso autônomo (SNA) [1]. Entre as diferentes áreas centrais que organizam o controle das funções cardiovascular, respiratória e neuroendócrina, a região do diencefalo, em especial o hipotálamo, tem papel preponderante [1-3].

A ação de hormônios e neurotransmissores, como a grelina, é responsável pela efetivação das respostas orquestradas pelos eferentes autonômicos adequadamente recrutados [4, 5]. Recentemente, o papel da grelina em influenciar o sistema cardiovascular foi descrito em estudos que observaram efeito hipotensor e bradicárdico, quando a sua forma acilada interage com o subtipo 1a do receptor para os secretagogos do hormônio do crescimento (GHS-R1a) [6-10]. Tal receptor é densamente expresso no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), um núcleo pré-motor simpático de importância para o controle das funções cardiovasculares e neuroendócrinas [11-14].

Foi observado que a injeção direta de grelina no hipotálamo paraventricular (PVH) reduz a pressão arterial e a frequência cardíaca [15]. Uma vez que PVN é um dos grupos pré-motores simpáticos, cujos neurônios expressam GHS-R1a [16, 17], as hipóteses que surgiram foram: i) grelina e estes receptores podem ser responsáveis pela modulação da função cardíaca; ii) a atividade das sinapses gabaérgicas pode ser influenciada na presença de grelina e seus receptores. Portanto, este trabalho se propôs a investigar as respostas cardíacas desencadeadas pela interação entre grelina e GHS-R1a no hipotálamo paraventricular.

1.1 Regulação autonômica da função cardiovascular

A regulação nervosa da circulação é uma importante frente de atuação do Sistema Nervoso Autônomo (SNA) para a preservação da homeostase [18]. Seu estudo é de suma importância para a compreensão da história natural e tratamento

de determinados estados fisiopatológicos que envolvem o sistema cardiovascular (SCV), incluindo diabetes e hipertensão arterial sistêmica [19].

O SNA é um sistema predominantemente eferente que transmite impulsos do sistema nervoso central (SNC) para órgãos periféricos [19]. Seus efeitos incluem, entre outros, controle sobre o cronotropismo, inotropismo e tônus dos vasos sanguíneos [20]. Os nervos autonômicos incluem todas as fibras eferentes que partem do SNC, à exceção daquelas que inervam o músculo esquelético, e possui três grandes divisões anatômicas: Sistema nervoso simpático (SNS), sistema nervoso parassimpático (SNP) e o sistema nervoso entérico (SNE) [21].

A modulação autonômica das funções cardiovasculares é de fundamental importância para a regulação da pressão arterial, resistência periférica e débito cardíaco [22, 23]. Tal regulação é exercida por um fino balanço entre os sistemas nervosos simpático e parassimpático [24], ao integrar ações de controle tônico e reflexo a regiões específicas do SNC, especialmente de núcleos hipotalâmicos [25].

Tanto comportamento e emoções, quanto o sistema imunológico podem influenciar o controle do SNA sobre o sistema cardiovascular [21, 26]. Exemplos clássicos dessas influências, incluem respostas cardiorrespiratórias moduladas pelo exercício físico, exposição a um ambiente estressante, doenças inflamatórias e mesmo a mudanças de posição supina para ortostática [21, 27]. Face a determinado estado metabólico e a demandas termoregulatórias, o SNA ajusta o fluxo sanguíneo local e a resposta cardíaca, associando-os às redes respiratórias centrais [27].

Os efeitos simpáticos sobre o coração são mediados predominantemente por receptores adrenérgicos do subtipo β_1 e manifesta-se por efeitos cronotópico, dromotrópico e inotrópico positivos [28], enquanto a inervação parassimpática reduz frequência, a velocidade de condução e a excitabilidade cardíaca [29], atuando sobre o coração por intermédio de receptores muscarínicos [30]. Ambos os sistemas orquestram a atividade cardíaca [27, 31, 32], portanto, frequência e força de contração são resultantes dos efeitos simpático e parassimpático [33].

Embora o tônus da maior parte dos vasos sanguíneos seja mantido por inervação simpática, alguns leitos, como o coronariano, recebem inervação dupla [34, 35]. A inervação simpática do sistema arterial é fundamental para a manutenção da resistência periférica e a regulação da pressão arterial, pois sua atuação nas arteríolas

provoca vasoconstrição, por meio de receptores adrenérgicos do subtipo α_1 no músculo liso arteriolar e, inversamente, a sua redução provoca vasodilatação [36, 37]. A liberação de norepinefrina/epinefrina em vasos sanguíneos de alguns territórios que expressam receptores adrenérgicos do subtipo β_2 , induz a vasodilatação [37, 38].

A geração de atividade simpática tônica e fásica, que pode ser medida em nervos periféricos, ocorre a partir de núcleos pré-motores simpáticos, compostos por neurônios que possuem propriedades eletrofisiológicas específicas, como os do bulbo ventrolateral rostral e do núcleo paraventricular do hipotálamo [39, 40].

1.2 O hipotálamo paraventricular e seu papel controlador do SNA

O hipotálamo é uma importante região do diencéfalo, localizado sob o tálamo, que participa do controle neuroendócrino da homeostase, sendo a principal conexão entre o sistema nervoso central e os efetores endócrinos periféricos, através da secreção de hormônios e de suas conexões com hipófise [41, 42]. Adicionalmente, o hipotálamo participa, além da regulação cardiovascular, do controle de diferentes funções, como: fome e sede, comportamento e termorregulação [43, 44].

Anatomicamente, o hipotálamo localiza-se entre o quiasma óptico e os corpos mamilares, em torno do III ventrículo, inferiormente ao sulco hipotalâmico que o separa do tálamo [45]. É limitado anteriormente pela lâmina terminalis, posteriormente pelo mesencéfalo, internamente pelo III ventrículo e lateralmente pela cápsula interna [45, 46]. O hipotálamo é constituído fundamentalmente por grupos de neurônios que se agrupam em núcleos, entremeando a estruturas de passagem como o fórnix, que percorre cada metade do hipotálamo em sentido rostro-caudal [47]. O fornix divide assim o hipotálamo em zona medial (pobre em mielina e rica em corpos celulares) e zona lateral (formada predominantemente por fibras axonais) [48, 49]. A zona medial está situada entre o fórnix e as paredes do III ventrículo, é composta pelos principais núcleos do hipotálamo [50, 51]. Na zona lateral (lateralmente ao fórnix e ao feixe mamilotalâmico) há uma predominância de fibras mielínicas com direção longitudinal [52]. Esta última é a região de passagem do feixe prosencefálico medial (Feixe medial do telencéfalo), um complexo de fibras que estabelece conexões recíprocas com a área septal (sistema límbico) e com a formação reticular do mesencéfalo [53, 54].

Juntamente com este feixe encontra-se ainda a área hipotalâmica lateral, que contém neurônios intimamente relacionados ao comportamento alimentar, como, por exemplo, aqueles produtores de orexina que se projetam para diferentes regiões do encéfalo [55-58].

Fibras nervosas descendentes originadas do hipotálamo fazem sinapse em neurônios pré-ganglionares simpático e parassimpáticos na medula espinhal (coluna intermédio-lateral) e no tronco encefálico, respectivamente [59, 60]. Esta via, o trato hipotálamo espinhal, origina-se principalmente no núcleo paraventricular [16, 59]. Embora constitua uma conexão direta entre neurônios hipotalâmicos e neurônios pré-ganglionares, essa via é apenas uma pequena parte das influências descendentes sobre os neurônios pré-ganglionares [16]. Neurônios da parte parvocelular do núcleo paraventricular formam a maior concentração individual de neurônios motores simpáticos autonômicos [61].

O PVH localiza-se adjacente ao terceiro ventrículo, situado dorsalmente ao núcleo supra-óptico e lateralmente ao III ventrículo (**Figura 1**). Este divide-se em duas regiões: região magnocelular e região parvocelular [61]. Os neurônios magnocelulares localizam-se nas porções laterais do PVH e são especializados na síntese de vasopressina (VP), um hormônio neurohipofisário que participa do controle hidro-eletrolítico [62, 63]. Os neurônios parvicelulares localizam-se medialmente e constituem uma população heterogênea de neurônios, contendo múltiplos neurotransmissores destinados à realização de diversas funções [64]. Parte desses neurônios, especificamente aqueles localizados nas porções dorsal e ventral da região parvicelular, projetam-se para outras regiões do SNC envolvidas no controle das funções autonômicas, como o bulbo rostroventrolateral (RVLM), e a coluna intermediolateral (IML) [65-67].

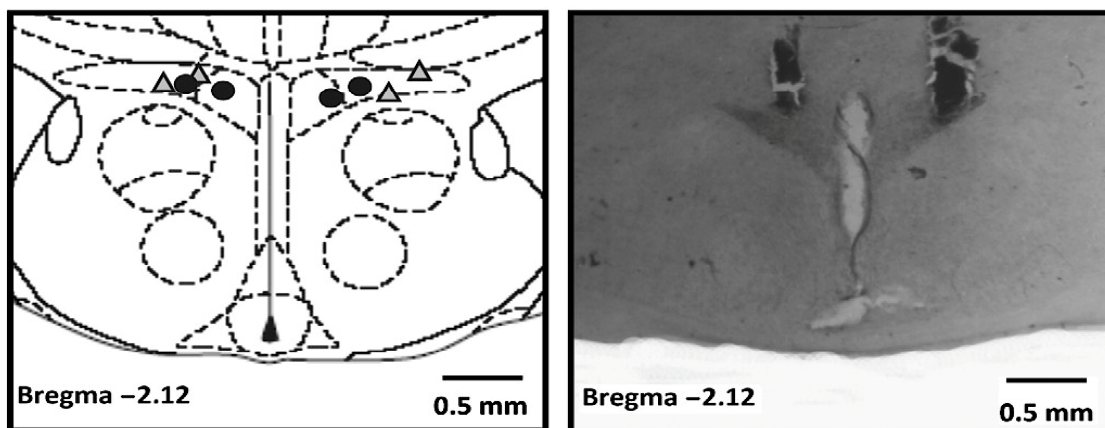


Figura 1. Representação esquemática (à esquerda) e imagem de histologia de cérebro (à direita) evidenciando o núcleo paraventricular do hipotálamo. Note na figura à direita as marcas de corante, mostrando os sítios de injeção no PVH bilateralmente [68].

O PVH abriga neurônios pré-motores simpáticos que se projetam para vários níveis da medula espinal [69]. Sua atividade tônica é controlada por diferentes tipos de sinapses [69]. A estimulação do PVH provoca respostas pressoras e taquicárdicas mediadas pelo sistema nervoso simpático [70-72]. Em contrapartida, sua inibição reduz a pressão arterial e a frequência cardíaca, pela simpatoinibição e influência vagal para o coração [72, 73]. Além disso, o PVH conecta-se a várias estruturas límbicas envolvidas no controle comportamental, bem como com estruturas prosencefálicas e bulbares envolvidas no controle cardiovascular [74-76].

Um estudo clássico realizado por Allen descreveu o envolvimento do PVN na gênese da hipertensão arterial [77]. A redução da pressão arterial e atividade simpática renal provocada pela inibição dos neurônios do PVH foi significativamente maior em animais espontaneamente hipertensos – um modelo de aumento na atividade simpática [77, 78]. Adicionalmente, em modelos de insuficiência cardíaca, que provocam aumentos de atividade simpática para o coração, há um aumento da atividade de neurônios do PVH [79, 80]. Conjuntamente, estes estudos demonstram o papel do PVH e suas diferentes sinapses na gênese da hiperatividade simpática para diferentes leitos cardiovasculares e na fisiopatologia desse sistema.

1.3 Sinapses gabaérgicas que atuam sobre o PVH

A atividade tônica dos neurônios pré-motores simpáticos do PVH depende do equilíbrio das sinapses excitatórias e inibitórias, cujos neurotransmissores e neuromoduladores envolvidos são o glutamato, o GABA, a noradrenalina, as angiotensinas e o óxido nítrico [81-83]. No presente estudo avaliamos as influências das sinapses gabaérgicas quando da presença de grelina sobre os neurônios do PVH.

O SNC apresenta altas concentrações de determinados aminoácidos que se ligam a receptores pós-sinápticos, atuando, assim, como neurotransmissores inibitórios ou excitatórios [84-86]. Das duas classes principais de aminoácidos neuroativos, o ácido γ -aminobutírico (GABA) é o principal aminoácido inibitório no SNC dos mamíferos [87-89]. As membranas celulares da maioria dos neurônios e astrócitos do SNC de vertebrados expressam receptores de GABA, que diminuem a excitabilidade neuronal através de vários mecanismos [88]. Em virtude de sua distribuição disseminada, os receptores de GABA influenciam muitos circuitos e funções neurais [88]. Os fármacos que modulam os receptores de GABA afetam a reatividade e a atenção, a formação da memória, a ansiedade, o sono e o tônus muscular [90].

Existem dois tipos de receptores de GABA [88]. Os receptores de GABA ionotrópicos (GABAA e GABAC) consistem em proteínas de membrana de múltiplas subunidades que se ligam ao GABA e que abrem um canal iônico intrínseco de cloreto [91]. Os receptores de GABA metabotrópicos (GABAB) são receptores heterodiméricos acoplados à proteína G que afetam as correntes iônicas neuronais através de segundos mensageiros [92, 93]. Os receptores de GABA mais abundantes no SNC consistem nos receptores ionotrópicos GABAA, que são membros da superfamília de canais iônicos regulados por neurotransmissores rápidos [94]. Os receptores GABAA são glicoproteínas transmembrana pentaméricas organizadas para formar um poro iônico central circundado por cinco subunidades, tendo, cada uma delas, quatro domínios transmembrana [94]. Os agonistas como o muscimol ativam o receptor GABAA através de sua ligação direta ao sítio de ligação do GABA [95]. Por outro lado, há antagonistas competitivos que se ligam aos sítios do GABA nos receptores GABAA [96].

Um crescente número de trabalhos fomenta evidências de que uma mudança na atividade inibitória do GABA sobre o PVH combinada com aumentos nos inputs excitatórios glutamatérgicos contribuem para a atividade simpática exacerbada

conduzindo na insuficiência cardíaca crônica [97, 98]. Com um possível desequilíbrio entre inputs glutamatérgicos e gabaérgicos no PVH pode-se contribuir para aumentar o fluxo simpático na insuficiência cardíaca e em dois diferentes territórios simpáticos, o renal (RSNA) e a atividade nervosa simpática esplênica (SSNA), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca [97].

Alguns estudos descreveram o envolvimento do PVH na gênese da hipertensão arterial [99]. A inibição dos neurônios do PVH pelo agonista de receptores de GABA_A, muscimol, reduziu a pressão arterial e a atividade simpática renal de animais normotensos e hipertensos [100]. Entretanto, as respostas cardiovasculares observadas nos animais hipertensos foram significativamente maiores do que aquelas vistas nos animais normotensos. A partir destes estudos, foi possível concluir que alterações gabaérgicas no PVH participam da gênese da hipertensão primária [101, 102]. A estimulação do PVH por antagonista dos receptores GABA_A aumenta o fluxo simpático para diferentes leitos, enquanto sua inibição por agonistas destes mesmos receptores (muscimol) diminui a influência simpática [103, 104].

Apesar das evidências consistentes de que a atividade dos neurônios do PVN é controlada por vários neurotransmissores, como GABA e glutamato, pouco se sabe sobre a influência de hormônios e neuropeptídeos sobre esses neurônios [105]. Considerando que os neurônios do PVN são ativados após injeção intracerebroventricular de grelina, é importante estudar a contribuição dos receptores GHS-R1a para as atividades controladas por esse núcleo [106].

1.4 O hormônio Grelina

A Grelina (**Figura 2**) é um peptídeo hormonal, composto por 28 aminoácidos, descoberto em 1999 pelo pesquisador japonês Kojima e seus colaboradores no estômago de ratos, utilizando a técnica de farmacologia reversa [107]. Sua descoberta marcou o fim da corrida científica pelo ligante endógeno do receptor de secretagogo do hormônio do crescimento (GHSR), iniciada em meados da década de 1970 com a descoberta de compostos sintéticos capazes de induzir a liberação de GH de forma mais contundente que o próprio hormônio liberador do hormônio do crescimento

(GHRH) [107-109]. Em função disso, a grelina, em inglês ghrelin, foi assim batizada em alusão à GH, sigla em inglês para hormônio do crescimento [107, 108].

Mais tarde, pesquisadores revelaram o papel da grelina como hormônio regulador do apetite, estimulador da secreção ácida do estômago e da motilidade gastrointestinal, e indutor ou iniciador do comportamento de busca por alimento, sendo então consagrada como “o hormônio da fome” [107, 110, 111]. Dessa observação seguiram-se muitas outras pesquisas sobre a participação da grelina no controle do metabolismo e do balanço energético [112].

Produzida principalmente pelas células secretórias das glândulas oxínticas do estômago, mas também em menores quantidades em outros órgãos, como hipotálamo, duodeno, coração, rins e pulmões, a grelina tem por função principal regular a ingestão alimentar, estimulando o apetite e o balanço energético [112]. Além disso, a Grelina está envolvida em muitos outros processos fisiológicos, como na estimulação da liberação do Hormônio do crescimento, no controle da motilidade gástrica e da secreção ácida, na função endócrina e exócrina pancreática, no controle de sono e no comportamento [113-115].

A grelina apresenta quatro isoformas: três aciladas e uma não acilada, e esta última representa 80% da grelina circulante [116-118]. A acilação é um processo essencial pelo qual esse hormônio deve passar para desempenhar suas funções endócrinas, pois somente nessa forma ela pode atravessar a barreira hemato-encefálica e ligar-se aos seus receptores no sistema nervoso central [118, 119].

O sítio de ligação da grelina para a liberação do GH no hipotálamo é o GHSR, em especial seu subtipo 1a (GHS-R1a) [120, 121]. Embora apresente menor afinidade pelo receptor GHS-R1a, a isoforma não-acilada ainda é capaz de exercer algumas ações não endócrinas incluindo efeitos cardiovasculares e antiproliferativos [122].

Neurônios contendo o neuropeptídeo Y (NPY) no núcleo arqueado do hipotálamo são os principais alvos da grelina [120, 123].

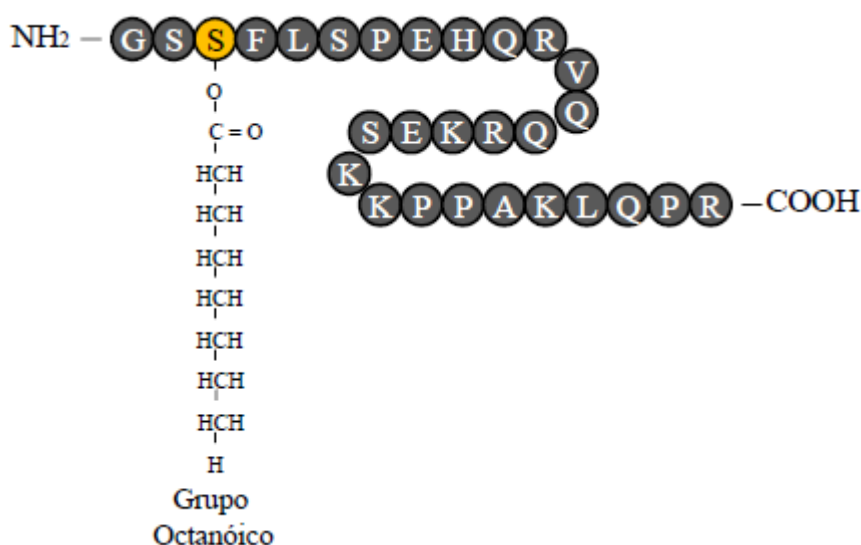


Figura 2. Representação estrutural da grelina. Adaptado de Kojima e Kangawa [124].

Estudo anterior observou que os efeitos cardiovasculares da grelina resultam em diminuição da pressão arterial sem alterar significativamente a frequência cardíaca [125]. Mais recentemente, foi observado que tanto a administração central quanto periférica de grelina e de agonistas de seu receptor, produz efeitos cardiovasculares mediados predominantemente pelo sistema nervoso autônomo [125]. Dados consistentes demonstram substancial queda nos níveis de atividade simpática em diferentes leitos, o que resultaria em redução da influência simpática para o coração e para os vasos sanguíneos [126, 127].

A administração central de grelina provoca efeitos neuroendócrinos e cardiovasculares, possivelmente através do recrutamento de áreas centrais sabidamente envolvidas na regulação da homeostase, como o hipotálamo [125, 126]. Foi observado que a injeção central de grelina provoca expressão da proteína c-fos (um marcador de ativação neuronal recente) em áreas hipotalâmicas como os núcleos arqueado, paraventricular (PVN), dorsomedial (DMH), ventromedial (VMH) e lateral (LHA) [106].

Tem sido demonstrado que a atividade central da grelina depende de inputs gabaérgicos em algumas regiões [128]. Cabral e colaboradores demonstraram que a grelina circulante modifica a atividade de neurônios gabaérgicos e medeia esvaziamento gástrico, uma função controlada pelo sistema nervoso autônomo [128]. Além disso, foi relatado que a grelina aumenta a neurotransmissão gabaérgica no núcleo da amígdala [128, 129]. O antagonismo do receptor GABA_A bloqueia a ativação

do eixo HPA induzido pela grelina em condições de estresse agudo [130]. Apesar disso, não há estudos que descrevam a influência da grelina e das sinapses gabaérgicas do PVN sobre o controle da função cardíaca. Portanto, a hipótese do nosso trabalho é que a grelina e os receptores GHS-R1a atuam no PVN contribuindo para o controle da função cardíaca, através da modulação das influências gabaérgicas sobre esses neurônios.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel da grelina e seus receptores expressos pelos neurônios pré-motores simpáticos do hipotálamo paraventricular na regulação autonômica cardiovascular em ratos Wistar.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar a amplitude das respostas cardiovasculares evocadas pela injeção da grelina no hipotálamo paraventricular;

Avaliar a amplitude das respostas cardiovasculares evocadas pelo bloqueio dos receptores de grelina GHS-R1a no hipotálamo paraventricular;

Avaliar a influência da grelina sobre o tônus gabaérgico que atua nos neurônios do hipotálamo paraventricular.

3 METODOLOGIA

3.1 Drogas

As drogas utilizadas foram: i) a grelina (0,03 nM/100 nL); ii) o antagonista de receptores de grelina GHS-R1a: PF – 04628935 (0,06 nM/100 nL); iii) o agonista de receptores GABA_A: muscimol (20 mM/100 nL); iv) o anestésico: uretana (1,2 g/Kg - 1,4 g/Kg i.p.); v) o anestésico lidocaína com epinefrina (0,2 mL de lidocaína 2% + epinefrina 1:50.000 SC). Todos diluídos em solução salina estéril (NaCl – 0,9%).

3.2 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, adultos jovens, com peso entre 250 g e 350 g, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Goiás (GO – Brasil). Os procedimentos estão de acordo com as regras estabelecidas pelo COBEA e pelo U.S. National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [131]. Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais necessários para a conclusão dos experimentos.

Para realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados (i.p.) com uretana. A eficácia da anestesia foi verificada pela ausência de reflexo de retirada ao estímulo nociceptivo em um dos membros inferiores do animal e movimentação das vibrissas. Adicionalmente, os animais receberam injeções subcutâneas de anestésico local com vasoconstritor na região em que será realizada a craniotomia. Durante todos os procedimentos experimentais, os animais foram mantidos anestesiados e sua temperatura corporal foi mantida em torno de 37,5 °C por uma manta aquecedora.

3.3 Procedimentos cirúrgicos

3.3.1 Traqueostomia

Na superfície ventral do pescoço, próximo ao manúbrio esternal, foi feita uma pequena incisão na pele do animal. Foram divulsionadas e rebatidas as estruturas

musculares e após a localização da traquéia foi feito um pequeno orifício entre dois anéis cartilagosos para a inserção de uma cânula de diâmetro compatível (*JELCO Plus - n° 14G 7068 – Johnson & Johnson MEDICAL*). Dessa forma, foi possível aspiração endotraqueal (se necessário) e a manutenção das vias aéreas.

3.3.2 Canulação de artéria e veia femorais

Os ratos foram posicionados em decúbito dorsal e receberam uma incisão na região inguinal unilateral para dissecação do feixe vâsculo-nervoso femoral. Cânulas de polietileno PE-50 (15 cm) soldados a PE-10 (2 cm para veia e 4 cm para artéria) foram implantadas e fixadas por amarraduras. A cânula venosa foi utilizada para injeção de drogas e a extremidade livre da cânula arterial foi acoplada a um transdutor de pressão (*strain-Gauge – DT-XX Viggo-spectramed*) ligado a um amplificador e a um sistema de conversão analógico-digital para aquisição dos valores de pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC). Os valores de pressão arterial média (PAM) foram considerados uma medida da pós-carga cardíaca.

3.3.3 Cateterização do ventrículo esquerdo cardíaco

A artéria carótida direita do animal foi localizada e dissecada. Um cateter Millar (*SPR-249, Millar Instruments*) foi inserido na artéria e dirigido ao interior do ventrículo esquerdo cardíaco. O posicionamento do cateter no interior da câmara cardíaca foi confirmado quando o valor da pressão diastólica atingiu valores próximos a zero. Este x' permitiu aferir a pressão ventricular esquerda (LVP) e sua derivativa (LVdp/dt). Os valores de pico da derivada da LVP (LVdp/dt peak) foram considerados como uma medida da contratilidade cardíaca.

A confirmação do posicionamento do cateter no interior do ventrículo esquerdo cardíaco foi como exemplificado abaixo (**Figura 3**). A seta indica o momento em que o cateter adentra a câmara cardíaca, a partir do qual o sinal de pressão se diferencia. Valores aproximados de pressão arterial sistêmica sistólica e diastólica variam de 120 a 80 mmHg, respectivamente. Nota-se que, no registro de pressão ventricular, o valor

de pressão sistólica é similar ao achado da pressão arterial sistêmica. Entretanto, a pressão diastólica é próxima a 0 mmHg.

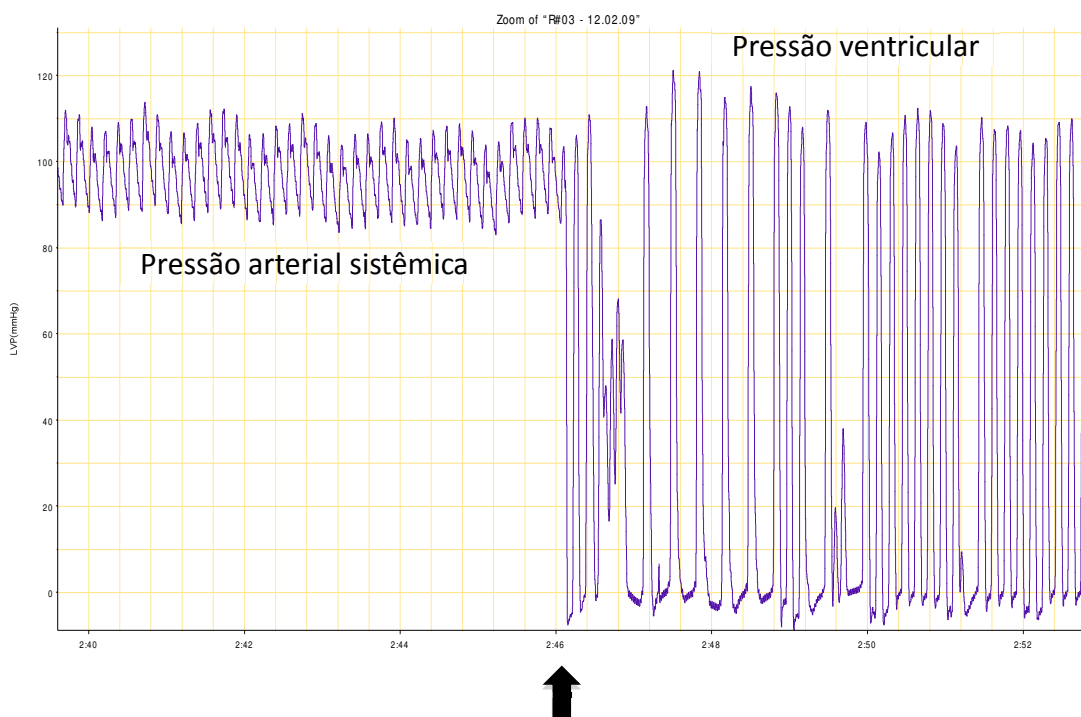


Figura 3. Sinal de pressão sanguínea evidenciando as diferenças entre os registros de pressão arterial periférica e pressão ventricular. A seta indica o momento em que o cateter adentra o ventrículo esquerdo cardíaco.

3.3.4 Craniotomia e localização do hipotálamo paraventricular

As coordenadas utilizadas foram baseadas no Atlas de Paxinos e Watson [132]. Os animais foram posicionados em um aparelho estereotáxico (*STOELTING, IL, USA*) com a cabeça posicionada 3,3 mm acima da linha interaural. As coordenadas de localização de núcleos a partir do bregma foram: ântero-posterior: -1,9 mm; dorso-ventral (DV): -8,0 mm; e látero-lateral (LL): $\pm 0,6$ mm. Após a realização de uma craniotomia local, uma micropipeta de ponta ultrafina foi inserida na região do PVH para nanoinjeção de drogas.

3.4 Grupos experimentais

Em todos os experimentos, os animais foram submetidos aos procedimentos de anestesia e cirurgia previamente descritos. Após um período mínimo de 20 min, já

em registro, para estabilização dos parâmetros cardiovasculares, foram realizadas as nanoinjeções centrais das drogas no PVN, em aparelho estereotáxico. Para contemplar cada objetivo específico supracitado, os experimentos foram divididos nos seguintes grupos experimentais (n = 6 cada):

Grupo 1 – Respostas cardíacas evocadas pela ativação dos receptores GHS-R1a mediante injeção de grelina: os animais receberam injeção unilateral (100 nL) de grelina (0,03 nM) no PVH. Esperou-se um período de 20 min para observar as respostas evocadas. A amplitude das respostas evocadas pela grelina foi comparada aos valores basais.

Grupo 2 - Respostas cardíacas evocadas pelo antagonista do receptor da grelina GHS-R1a (PF – 04628935): os animais receberam nanoinjeção unilateral (100 nL) de PF – 04628935 (0,06 nM) no PVH. Esperou-se um período de 20 min para observar as respostas evocadas. A amplitude das respostas evocadas pela grelina foi comparada aos valores basais.

Grupo 3 - Respostas cardíacas evocadas pela grelina após a estimulação de receptores GABA_A no PVH: os animais receberam inicialmente nanoinjeção unilateral (100 nL) de Muscimol (20 mM), um antagonista dos receptores GABA_A, no PVH. Após 10 min, foi realizada nanoinjeção unilateral (100 nL) de grelina (0,03 nM). Esperou-se um período de 20 min para observar as respostas evocadas pelas injeções. A amplitude das respostas evocadas pela grelina foi comparada aos valores basais e entre as injeções no PVH.

3.5 Análise Histológica

Ao fim dos experimentos, os animais receberam nanoinjeção de corante azul Evans (100 nL) no PVN e os cérebros foram removidos, mantidos em paraformaldeído 10% e transferidos para solução de sacarose a 30% por 48 h antes do posterior corte (40 µm) no criostato. Para análise histológica, foram montadas secções em lâminas previamente gelatinizadas e coradas com vermelho neutro. Os locais de nanoinjeções foram comparados com o atlas de Paxinos e Watson [133].

3.6 Aquisição e Análise Estatística dos Dados

Os dados foram adquiridos usando *PowerLab 4/20* e *LabChart 7.0* (*ADInstruments, Sydney, Austrália*) e exibidos *on-line*. As análises estatísticas foram realizadas usando o *GraphPad Prism 6*. As comparações entre as respostas evocadas por nanoinjeções no PVN foram determinadas pelo teste *t-student*. A significância foi tomada em $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média $\pm$ SE.

4 RESULTADOS

A **Figura 4** mostra uma foto de um corte frontal do encéfalo de rato em lâmina histológica preparada conforme a metodologia anteriormente descrita (**ítem 3.5**). As lâminas foram utilizadas para comparação com diagramas histológicos do Atlas de Paxinos & Watson [132], permitindo a confirmação das microinjeções feitas no PVH.

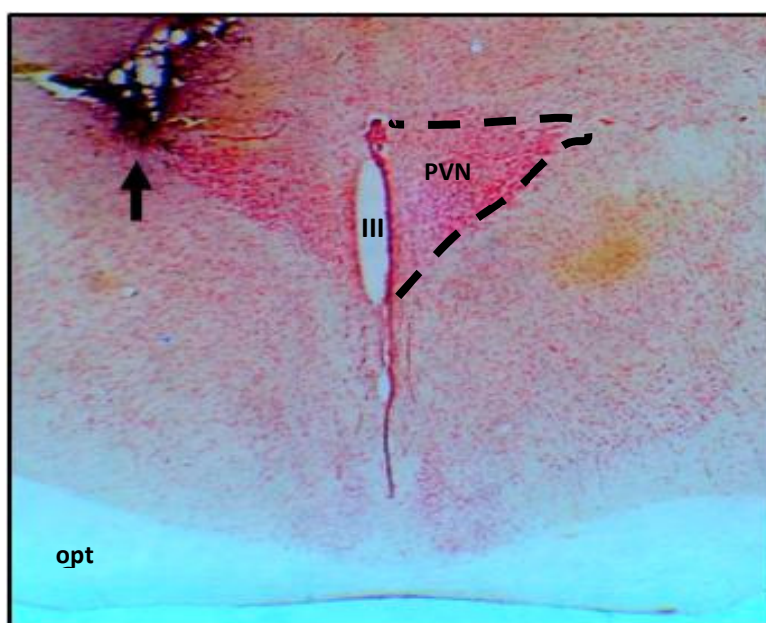


Figura 4. Fotomicrografia de sítio de nanoinjeção no hipotálamo paraventricular em lâmina histológica de um corte frontal do encéfalo de rato (40 μ m). Na base, horizontalmente, está o feixe fibroso do trato óptico (opt). No centro, o eixo vertical é demarcado pela fenda do terceiro ventrículo (III). O núcleo paraventricular (PVN) está delimitado pelas linhas pontilhadas. A seta indica o local de nanoinjeção na extremidade lateral do PVN direito.

4.1 Respostas cardíacas produzidas pela injeção de grelina no PVH

A **Figura 5** exemplifica a distribuição dos sítios de nanoinjeção marcados com corante nos animais que receberam injeção de grelina no PVH. A nanoinjeção unilateral de grelina no PVH promoveu alterações significativas nos parâmetros cardiovasculares.

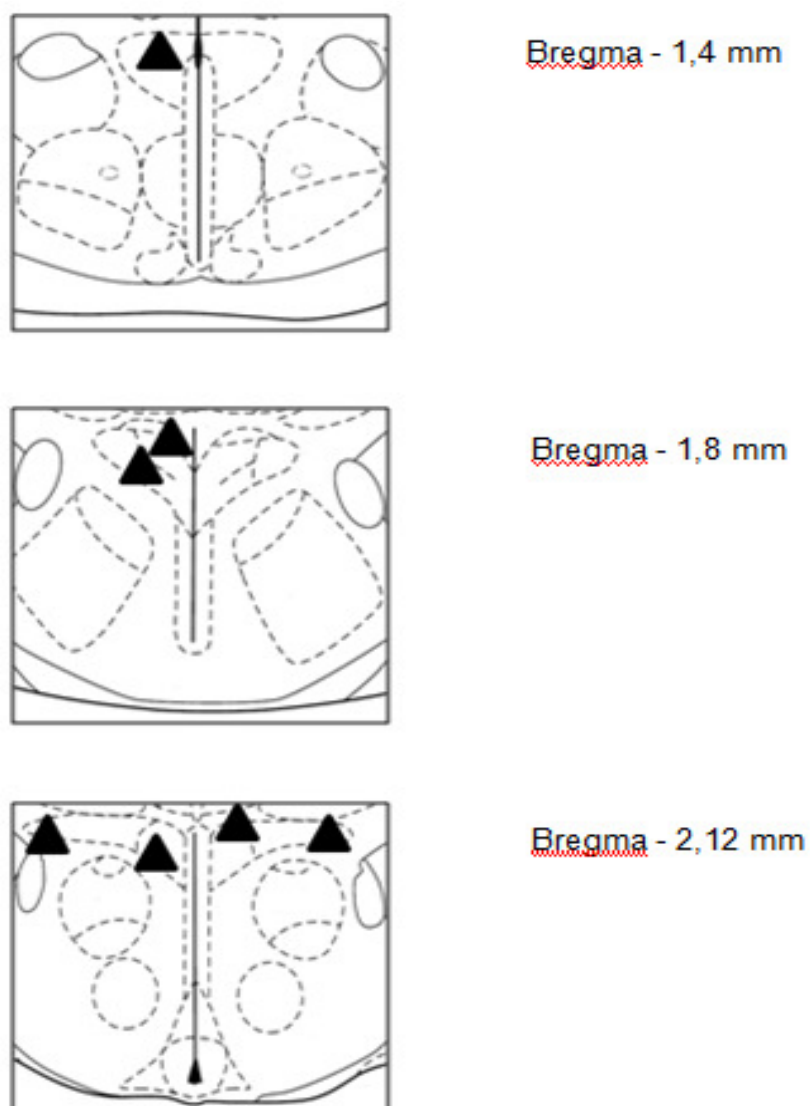


Figura 5. Representação esquemática dos sítios marcados pela nanoinjeção de corante azul de Evans do grupo em que foi administrado grelina (100 nL) no PVH. Cada sítio de injeção corresponde a um experimento ($n = 7$).

A **Figura 6** ilustra o efeito da nanoinjeção (100 nL) unilateral do hormônio grelina na concentração de 0,03 nM no PVH sobre os parâmetros cardiovasculares. A nanoinjeção de grelina reduziu significativamente a PAM, a LVP máxima e a LVdP/dt máxima. Entretanto, a redução na FC não foi significativa. Este efeito pode ser evidenciado já nos primeiros 10 min após a nanoinjeção, alcançando respostas máximas aos 15 min.

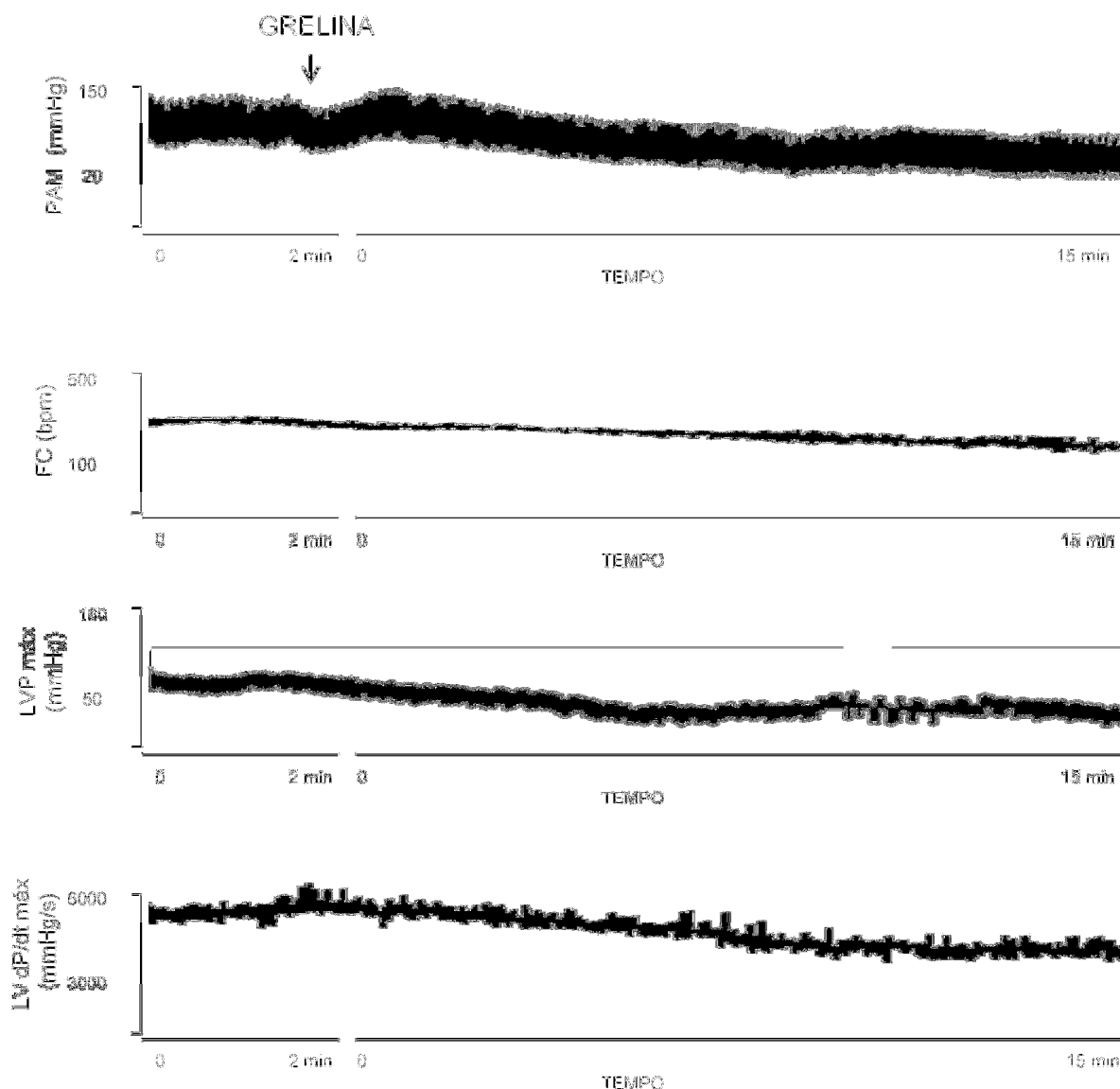


Figura 6. Registros gráficos ilustrando as respostas de PAM, FC, LVP_{máx} e LVdP/dt_{máx} produzidas pela nanoinjeção unilateral de grelina no PVH. A seta indica o momento da injeção para todos os parâmetros

A injeção de grelina no hipotálamo paraventricular reduziu a pressão arterial (Δ PAM: 40 ± 12 mmHg, $p < 0,05$ vs. Basal), a pressão ventricular esquerda (Δ LVP_{máx}: -28 ± 12 mmHg, $p < 0,05$ vs. Basal) e sua derivativa (Δ LVdP/dt_{máx}: -2051 ± 946 mmHg/s; $p < 0,05$ vs. basal), sem provocar mudanças significativas no cronotropismo cardíaco (Δ FC: -6 ± 14 bpm; $p < 0,05$ vs. basal) (**Figura 7**).

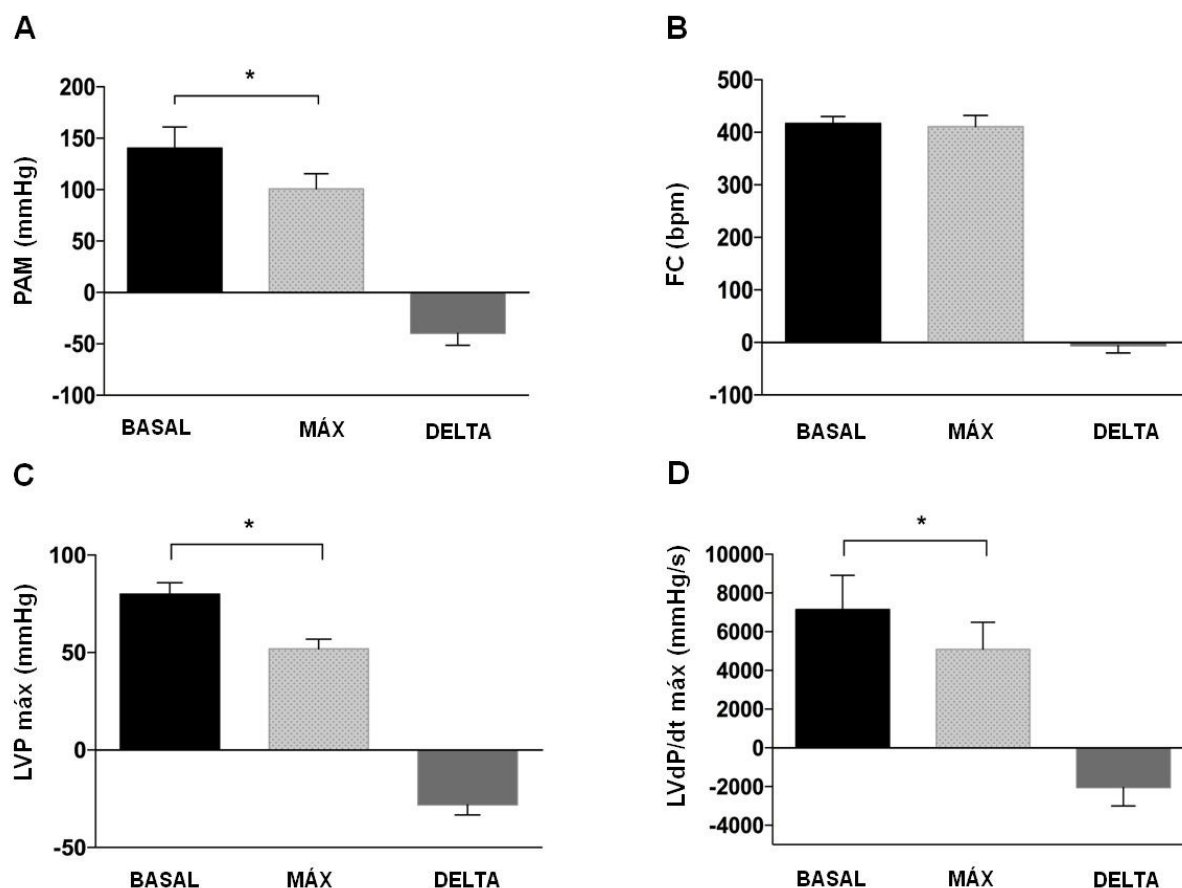


Figura 7. Valores de PAM (painel A), FC (painel B), $LVP_{máx}$ (painel C) e $LVdP/dt_{máx}$ (painel D) em resposta à nanoinjeção unilateral de grelina (100 nL). Valores referentes as médias coletadas no período basal (2 min antes da injeção central), no ponto máximo da resposta a nanoinjeção de grelina, e a variação entre elas. As médias foram comparadas usando teste *t* de *student*; * $p < 0,05$. PAM, pressão arterial média; FC, frequência cardíaca; $LVP_{máx}$, pressão máxima no ventrículo esquerdo; $LVdP/dt_{máx}$, derivada de pressão por tempo dentro do ventrículo esquerdo.

4.2 Respostas cardíacas produzidas pelo antagonismo dos receptores GHS-R1a (injeção de PF04628935) no PVH

A **Figura 8** exemplifica a distribuição dos sítios de nanoinjeção marcados com corante nos animais do grupo 2, que receberam injeção de PF04628935 no PVH. A nanoinjeção unilateral de PF04628935 no PVH promoveu alterações significativas nos parâmetros cardiovasculares.

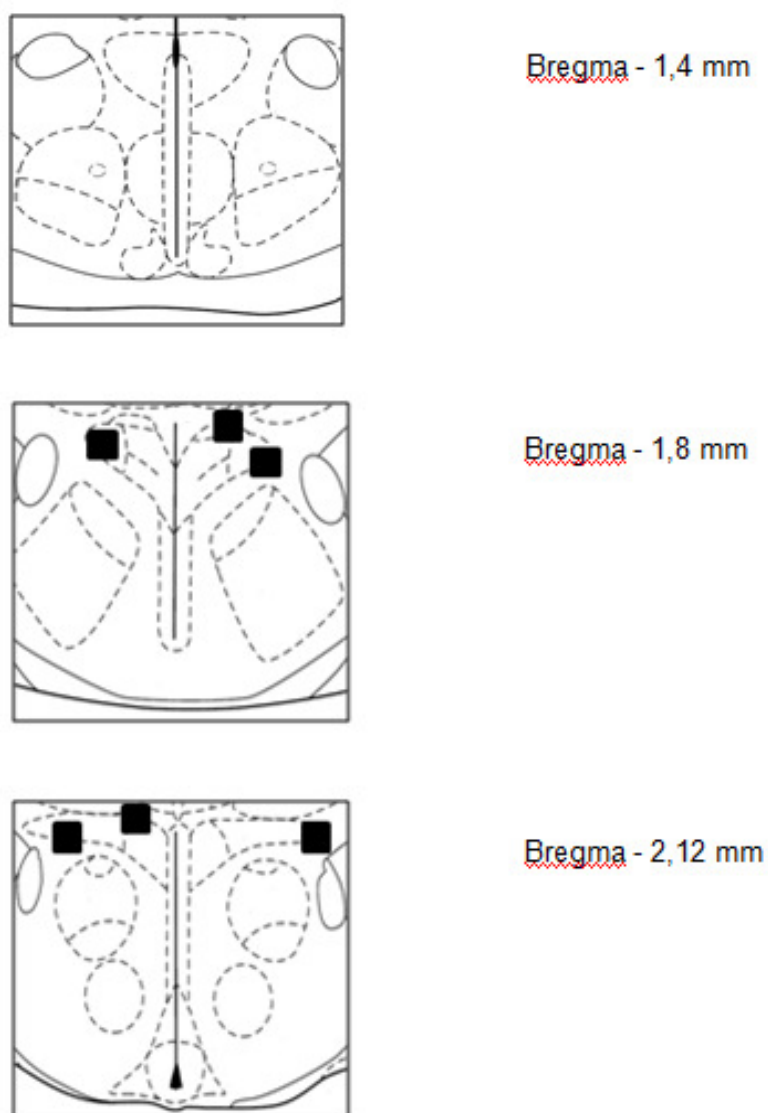


Figura 8. Representação esquemática dos sítios marcados pela nanoinjeção de corante azul de Evans do grupo em que foi administrado PF04628935 (100 nL) no PVH. Cada sítio de injeção corresponde a um experimento ($n = 6$).

A **Figura 9** ilustra os efeitos da nanoinjeção (100 nL) unilateral de PF04628935 na concentração de 0,06 nM no PVH, sobre a PAM, FC, $LVP_{máx}$ e $LVdP/dt_{máx}$. Estes efeitos podem ser observados em 15 min em média após a nanoinjeção, apresentando aumento significativo dos valores de PAM, FC, $LVP_{máx}$ e $LVdP/dt_{máx}$.

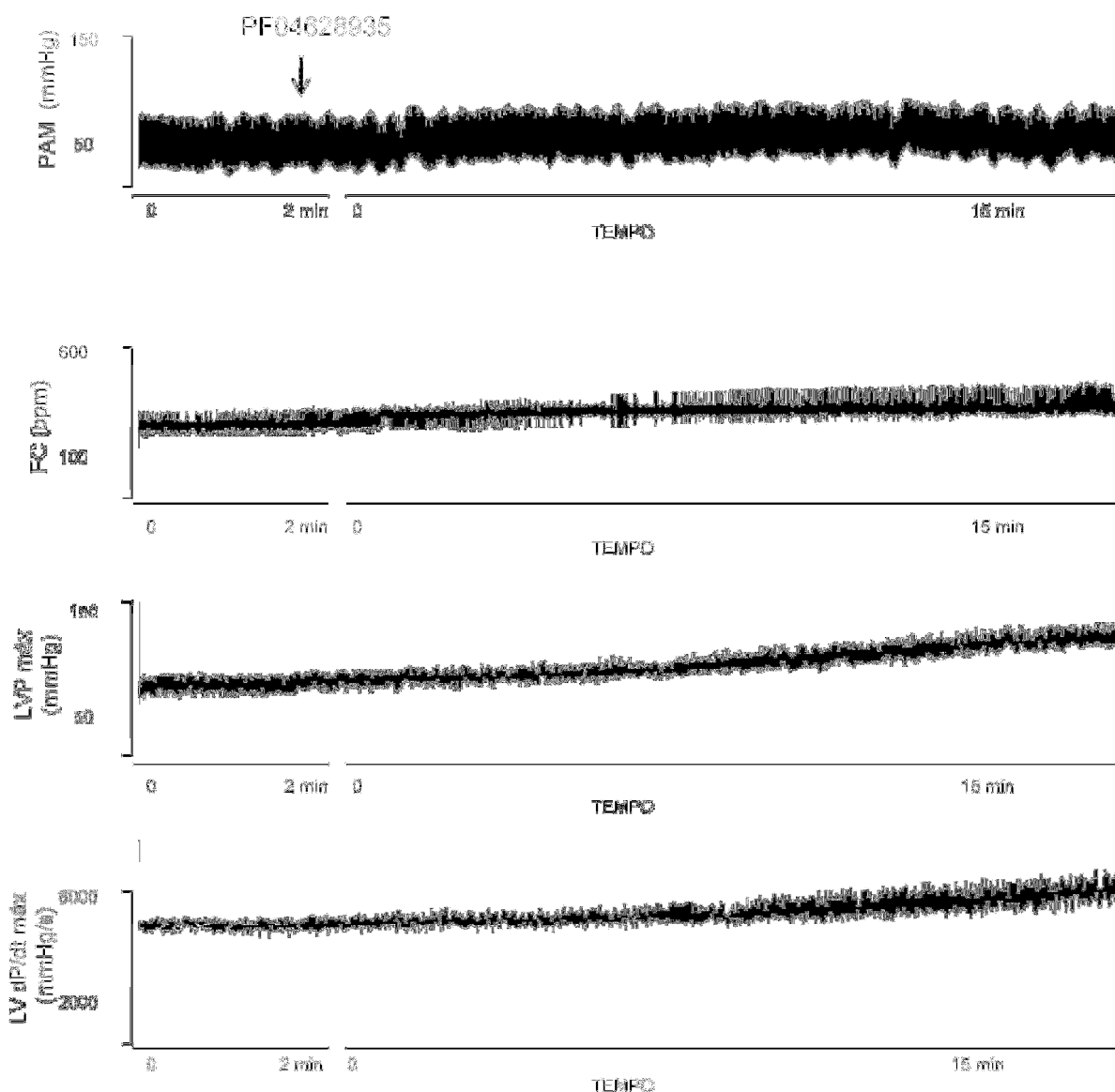


Figura 9. Registros gráficos ilustrando as respostas de PAM, FC, LVP_{máx} e LVdP/dt_{máx} produzidas pela nanoinjeção unilateral de PF04628935 no PVH. A seta indica o momento da injeção para todos os parâmetros.

A **Figura 10** mostra a média das alterações máximas provocadas pela injeção de PF04628935 no PVH. Ao contrário do verificado após a injeção de grelina, o bloqueio dos efeitos da grelina endógena pelo antagonismo do GHS-R1a no hipotálamo paraventricular pela nanoinjeção de PF04628935 causou aumentos na pressão sistêmica (Δ PAM: 8 ± 3 mmHg; $p < 0,05$ vs. basal) e pressão cardíaca (Δ LVP_{máx}: 29 ± 8 mmHg/s; $p < 0,05$ vs. basal), além de provocar cronotropia positiva

(ΔFC : 29 ± 12 bpm; $p < 0,05$ vs. basal) e inotropia ($\Delta LVdP/dt_{m\acute{a}x}$: 1449 ± 467 mmHg/s; $p < 0,05$ vs. basal).

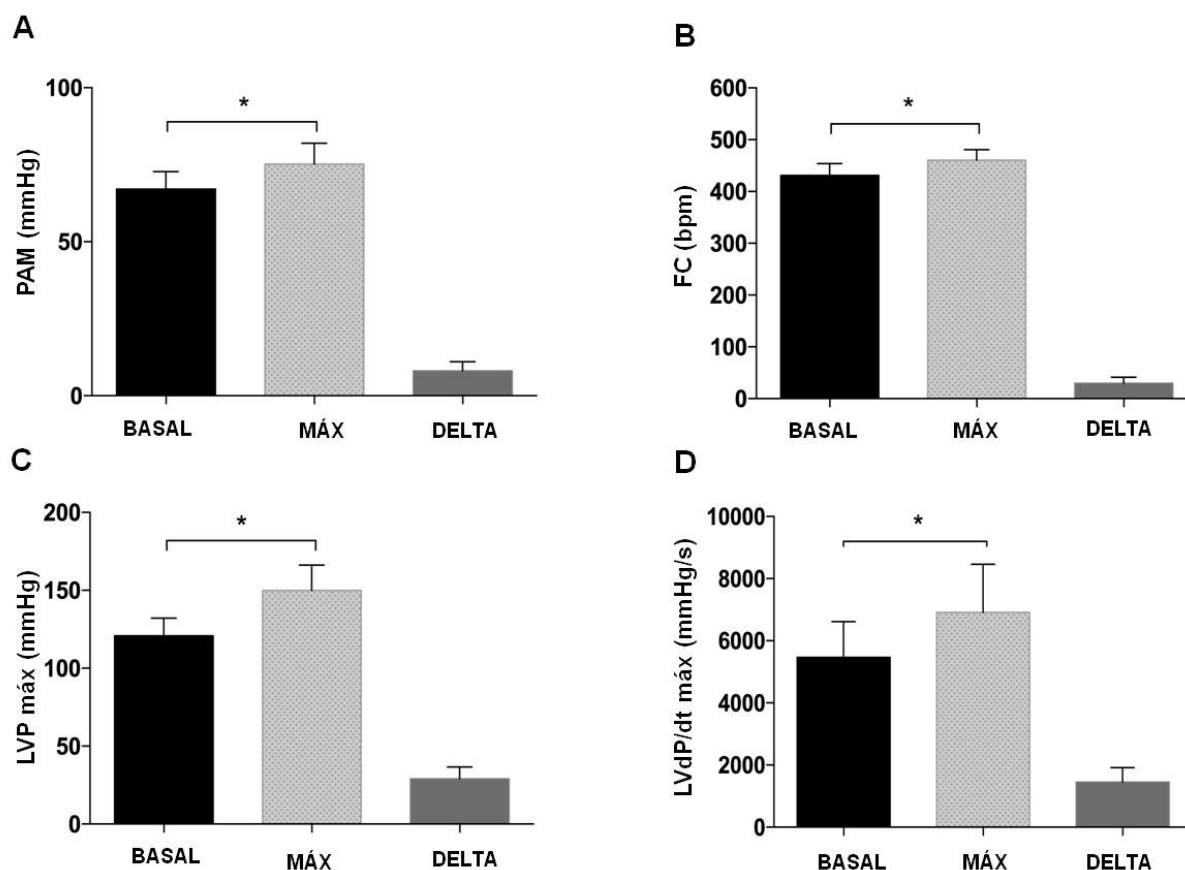
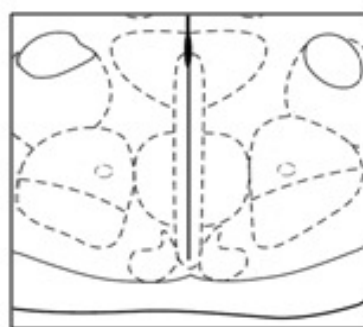


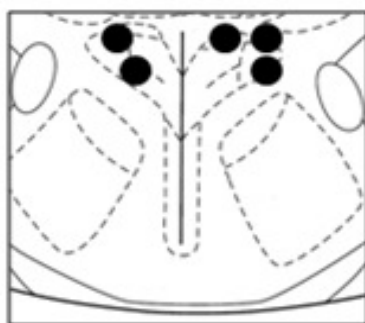
Figura 10. Média das alterações máximas da PAM (painel A), FC (painel B), $LVP_{m\acute{a}x}$ (painel C) e $LVdP/dt_{m\acute{a}x}$ (painel D) em resposta a nanoinjeção unilateral de PF04628935 (100 nL) no PVH. Valores referentes as médias coletadas no período basal (2 min antes da injeção central) e no ponto máximo de resposta à nanoinjeção de PF04628935, e sua variação. * $p < 0,05$. PAM, pressão arterial média; FC, frequência cardíaca; $LVP_{m\acute{a}x}$, pressão máxima no ventrículo esquerdo; $LVdP/dt_{m\acute{a}x}$, derivada de pressão por tempo dentro do ventrículo esquerdo.

4.3 Respostas cardíacas produzidas pela grelina após a estimulação dos receptores $GABA_A$ no PVH

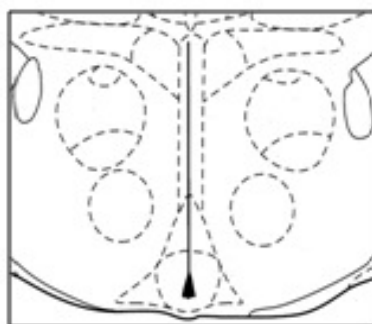
A **Figura 11** exemplifica a distribuição dos sítios de nanoinjeção marcados com corante nos animais que receberam injeção de muscimol e posteriormente de grelina no PVH. A nanoinjeção unilateral de muscimol seguida da nanoinjeção unilateral de grelina no PVH promoveu alterações significativas nos parâmetros cardiovasculares.



Bregma - 1,4 mm



Bregma - 1,8 mm



Bregma - 2,12 mm

Figura 11. Representação esquemática dos sítios marcados pela nanoinjeção de corante azul de Evans do grupo em que foi administrado muscimol (100 nL) e grelina (100 nL) no PVH. Cada sítio de injeção corresponde a um experimento (n = 5).

A **Figura 12** ilustra os efeitos da nanoinjeção unilateral de grelina 0,03 nM (100 nL) no PVH, após 10 min de nanoinjeção de muscimol 20 mM no mesmo sítio, sobre a PAM, a FC, a $LVP_{máx}$ e a $LVdP/dt_{máx}$. Estes efeitos promoveram um aumento significativo dos valores de PAM, FC, $LVP_{máx}$ e $LVdP/dt_{máx}$.

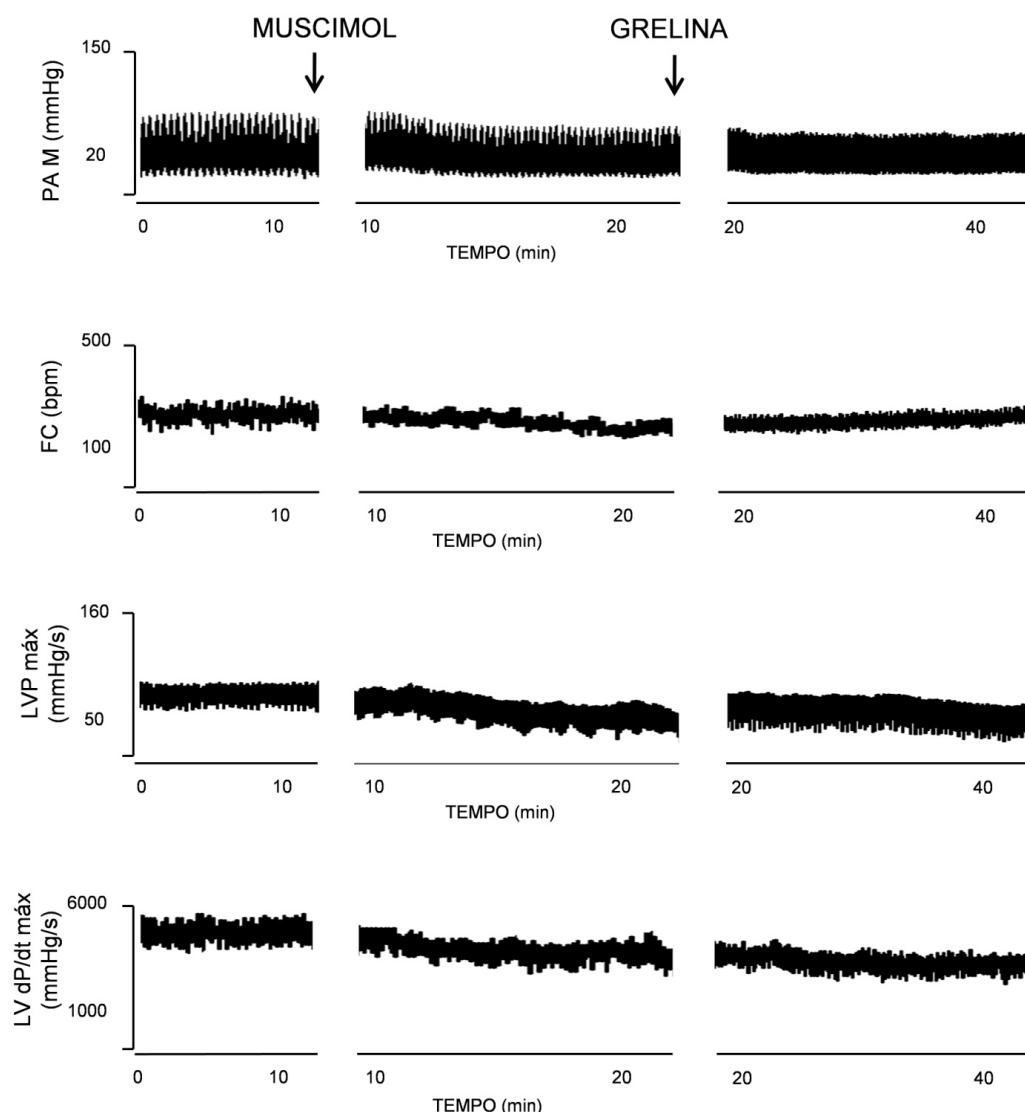


Figura 12. Registros gráficos ilustrando as respostas de PAM, FC, $LVP_{máx}$ e $LVdP/dt_{máx}$ produzidas pela nanoinjeção unilateral de muscimol (100 nL) e, após 20 min, de grelina (100 nL) no PVH. As setas indicam o momento das injeções para todos os parâmetros.

A injeção de muscimol reduziu os parâmetros cardiovasculares. A nanoinjeção subsequente de grelina durante a ativação de receptores de $GABA_A$ potencializou a redução da pressão arterial (ΔPAM : -19 ± 5 mmHg; $p < 0,05$ vs. Muscimol) sem alterar a pressão cardíaca ($\Delta LVP_{máx}$: -14 ± 12 mmHg/s ; $p < 0,05$ vs. Muscimol) e a contratilidade ($\Delta LVdP/dt_{máx}$ -1744 ± 1286 mmHg/s ; $p < 0,05$ vs. Muscimol). Curiosamente, a injeção de grelina durante a ativação dos receptores $GABA_A$

aumentou a cronotropia cardíaca (ΔFC : 27 ± 12 bpm; $p < 0,05$ vs. Muscimol) (**Figura 13**).

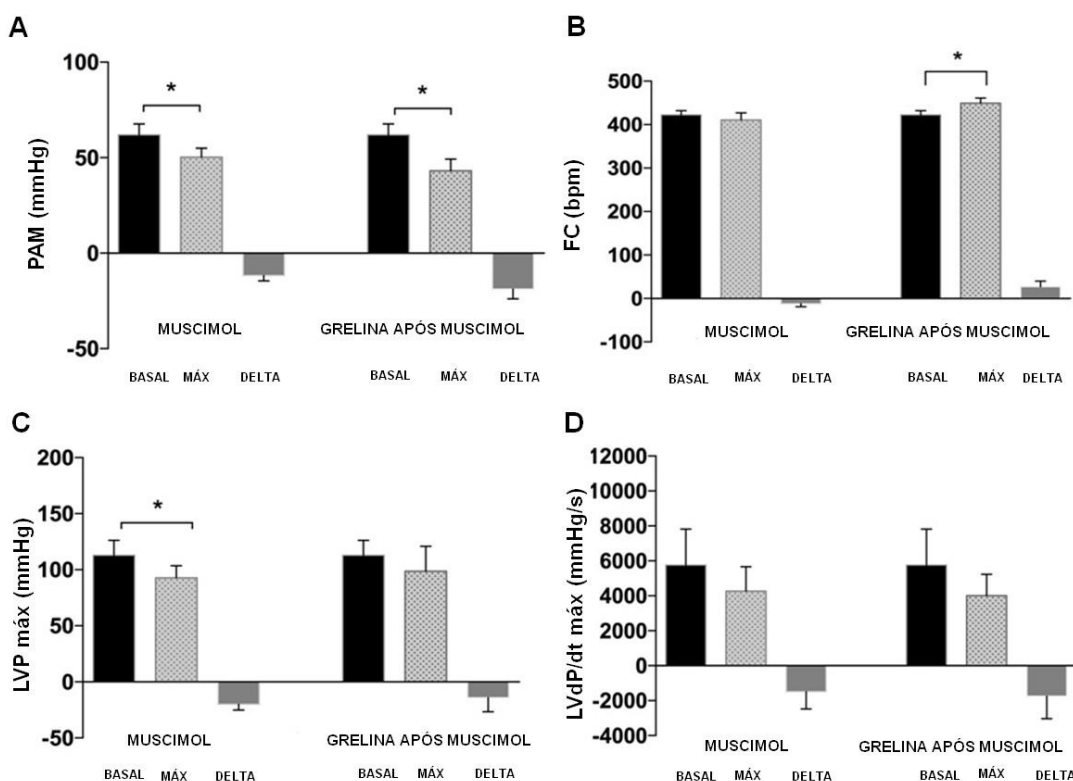


Figura 13. Média das alterações máximas da PAM (painel A), FC (painel B), $LVP_{máx}$ (painel C) e $LVdP/dt_{máx}$ (painel D) em resposta a microinjeções unilaterais de muscimol e de grelina (100 nL) no PVH. Valores referentes a médias coletadas no período basal (2 min antes da injeção central) e no ponto máximo de resposta às microinjeções de muscimol e de grelina e sua variação. $*p < 0,05$. PAM, pressão arterial média; FC, frequência cardíaca; $LVP_{máx}$, pressão máxima no ventrículo esquerdo; $LVdP/dt_{máx}$, derivada de pressão por tempo dentro do ventrículo esquerdo.

4.4 Sumarização dos Resultados

	GRELINA	PF04628935	MUSCIMOL	GRELINA APÓS MUSCIMOL
PAM	↓	↑	↓	↓
FC	—	↑	—	↑
$LVP_{máx}$	↓	↑	↓	—
$LVdP/dt_{máx}$	↓	↑	—	—

Tabela 1. Resumo dos resultados apresentados em todos os grupos experimentais e os efeitos sobre a PAM (pressão arterial média), FC (frequência cardíaca), $LVP_{máx}$ (pressão máxima no ventrículo esquerdo) e $LVdP/dt_{máx}$ (derivativa da pressão ventricular esquerda máxima) causados pela injeção de grelina (n = 7), de PF04628935 (n = 6) e de muscimol seguido de grelina (n = 5).

↑ Aumento, ↓ Diminuição, — alteração não significativa.

5 DISCUSSÃO

Os principais achados deste estudo foram: i) A injeção de grelina no PVH reduziu a pressão arterial e a contratilidade cardíaca sem afetar a cronotropia; ii) o bloqueio da grelina endógena pelo antagonismo do GHS-R1a no PVH aumentou a pressão, a frequência cardíaca e a contratilidade cardíaca; iii) A grelina potencializou os efeitos hipotensivos decorrentes da estimulação dos receptores GABA_A expressos pelos neurônios pré-motores simpáticos do PVH.

Desde os estudos seminais de Kojima [4], da descoberta da grelina até o presente momento, está se tornando indubitável que as características pleiotrópicas desse hormônio peptídico vão muito além de um papel no controle do metabolismo e do balanço energético [134]. Mesmo sendo predominantemente produzida por células oxínticas do estômago, a grelina é conhecida por controlar várias funções [134] e interferir em vários tecidos, incluindo áreas do cérebro e seus neurotransmissores, sugerindo que ela desempenha um importante papel integrador [135, 136]. Isso é fortemente apoiado por estudos que demonstram a presença de seu receptor GHS-R1a em vários órgãos e tecidos do corpo [137, 138]. Assim, o eixo grelina - GHS-R1a hipotalâmico constitui um alvo interessante para investigar a interferência deste peptídeo no controle autonômico de alguns sistemas, como o cardiovascular [139]. O GHS-R1a está amplamente distribuído no sistema nervoso central, incluindo o hipotálamo e, mais especificamente, a subdivisão do PVH [140]. Esses receptores também são encontrados no hipocampo, no órgão subfornical, na área postrema, no núcleo dorsal do vago, na área tegmentar ventral e no núcleo do trato solitário [141]. Estudos de hibridização *in situ* detectaram o mRNA da grelina em núcleos hipotalâmicos, no tronco encefálico, na substância negra e na área tegmentar ventral [142, 143].

Apesar de estar claro que o eixo grelina-GHS-R1a modula funções organizadas centralmente [144], ainda é bastante controverso que esse hormônio seja ativamente gerado por neurônios [128]. A expressão de grelina em neurônios hipocampais foi avaliada por Russo e colaboradores, que concluíram que neurônios produtores de grelina no hipocampo fazem projeções monossinápticas para a amígdala e o para o núcleo arqueado [145, 146].

Um estudo de Cruz e colaboradores investigou as vias neurais envolvidas no consumo de álcool, um agonista dos receptores GABA_A, e demonstrou que, na presença de grelina, houve aumento nos potenciais pós-sinápticos inibitórios [147]. Esses potenciais inibitórios foram aumentados durante efeitos simultâneos da grelina e do álcool, o que sugere claramente que a grelina seja capaz de amplificar as influências inibitórias do GABA e/ou a atividade dos receptores GABA_A [147].

A partir de abordagens eletrofisiológicas, as avaliações da influência da grelina em regiões da amígdala revelaram um papel importante desse hormônio na organização do comportamento alimentar e nos componentes emocionais ligados à ansiedade e ao estresse [148]. Recentemente, demonstramos que o eixo grelina-GHS-R1a potencializou a taquicardia evocada pela exposição ao estresse agudo [149]. Carlini e colaboradores avaliaram o papel da grelina quando administrada em regiões extra-hipotalâmicas, como os núcleos da amígdala e da rafe, verificando a sua participação nas respostas de ingestão de alimentos, formação de memória e comportamentos relacionados à ansiedade [150].

Injeções de grelina no núcleo do trato solitário provocaram redução da pressão arterial e da frequência cardíaca [151]. Já o bloqueio ganglionar farmacológico reverteu essas alterações, enquanto que o antagonismo muscarínico pela atropina não produziu efeito [151]. Logo, estes resultados confirmaram o envolvimento do ramo simpático nas respostas cardiovasculares evocadas pela grelina. Em adição, injeções de grelina no NTS reduziu significativamente a pressão arterial e a frequência cardíaca, concomitantemente à supressão da atividade simpática renal [151]. Em contrapartida, injeções do mesmo agente na área postrema caudal e na medula ventrolateral rostral não desencadearam efeitos na frequência cardíaca e pressão arterial [151].

No presente estudo, foram comparados os efeitos de: i) grelina (0,03 nM); ii) PF – 04628935 (0,06 nM), um antagonista do GHS-R1a; e iii) muscimol (20 mM), um agonista dos receptores de GABA_A; no PVH para avaliar a interação desses eixos moleculares e sua influência sobre o sistema cardiovascular. À luz das evidências acerca do importante papel das sinapses gabaérgicas para o controle de funções hipotalâmicas [152], nossa hipótese é que a grelina pode alterar a amplitude das influências do GABA sobre os neurônios do PVH. O tônus gabaérgico no PVH é

responsável pelo controle inibitório da atividade desses neurônios pré-motores simpáticos hipotalâmicos [153]. Nesse sentido, é possível que grelina e GHS-R1a possam afetar as influências gabaérgicas sobre esses neurônios.

Nossos resultados demonstraram que a continuidade na redução da pressão arterial e no aumento da frequência cardíaca quando a grelina foi injetada em sequência a ativação de receptores GABA_A no PVH, pela nanoinjeção de muscimol. Isso pode estar relacionado à evidência prévia sobre os efeitos da grelina durante o agonismo GABA_A pelo álcool, que demonstrou uma modulação nos potenciais pós-sinápticos inibitórios [152]. A hipotensão acompanhada de taquicardia parece ser resultado da predominância barorreflexa [154]. De fato, as projeções recíprocas entre o PVH e áreas do tronco encefálico que compõem o circuito bulbar do barorreflexo podem ser influenciadas tanto pelo efeito da manipulação de GABA quanto pelo efeito da manipulação de grelina - GHS-R1a [155, 156]. No entanto, a influência da grelina em cada componente do circuito barorreflexo ainda precisa ser melhor avaliado.

Tem sido sugerido que outros neurotransmissores, como a noradrenalina, podem modular a influência do GABA sobre a atividade neuronal de núcleos hipotalâmicos, como PVN [157-159], o que foi corroborado por Daftary e colaboradores [160]. *Inputs* glutamatérgicos intrahipotalâmicos também contribuem para a modulação das respostas evocadas pela noradrenalina [161, 162]. Aumentos na neurotransmissão glutamatérgica no PVH modulam a liberação de vasopressina e ocitocina [163, 164]. Portanto, o equilíbrio entre neurotransmissores excitatórios e inibitórios determina o controle da homeostase em diferentes sistemas, como o cardiovascular [164]. Neste sentido, as mudanças na neuroquímica e nos níveis de hormônios, cuja liberação é regida pelo PVH, podem modificar a função barorreflexa [165]. A estimulação do PVH reforça a contribuição dessa área para a regulação da função cardiovascular [166, 167].

No presente estudo, enquanto a injeção de grelina no PVH provocou respostas hipotensoras sem modificar o cronotropismo, a mesma injeção, quando realizada após muscimol, potencializou a hipotensão e foi acompanhada por uma taquicardia discreta, mas significativa. Matsumura e colaboradores relataram redução da pressão arterial sistêmica e atenuação da função barorreflexa em ratos conscientes pós modulação simpática por grelina [7]. Isso sugere fortemente um envolvimento do

componente vasomotor e de vias do barorreflexo, o que condiz com os relatos prévios sobre a contribuição do PVH para o controle da função barorreflexa [168]. Nossos dados experimentais, obtidos com animais anestesiados, previamente injetados com muscimol no PVH, sugerem um aumento na atividade simpática diretamente para o coração, evocada pela grelina nessa situação, possivelmente via mecanismos baroreflexos.

Neurônios do PVH podem alterar os níveis de pressão arterial, projetando-se diretamente para a coluna espinhal intermédio-lateral espinal – onde as eferências simpáticas são conduzidas – ou projetando-se para os neurônios pré-motores simpáticos da RVLM [168]. Portanto, é possível compreender a função exercida pela grelina sobre a modulação da atividade de neurônios que coordenam as funções cardiovasculares [169]. De fato, a inibição dos neurônios do PVH resulta na redução da atividade dos nervos simpáticos [170]. Isto reflete em ajustes da pressão arterial, da função renal, da atividade respiratória e da função cardíaca [170, 171]. Por exemplo, os neurônios do PVH são responsáveis pela super ativação simpática para o coração durante a insuficiência cardíaca [172]. Isso pode ser consequência de modificações nos inputs inibitórios sobre os neurônios do PVH, o que permitiria uma predominância de estímulos excitatórios dentro dessa área hipotalâmica [172]. Diante dessas evidências, um possível envolvimento do eixo grelina - GHS-R1a central na fisiopatologia de algumas doenças cardiovasculares parece plausível [173, 174].

Um recente estudo de Gaston e colaboradores demonstrou que doses ansiogênicas de grelina interferem no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, que é mediado pela ativação de receptores GABA_A [175]. Os padrões de adrenocorticotrofina, marcadores da resposta neuroendócrina ao estresse, foram avaliados em seres humanos infundidos com grelina [176, 177]. Verificou-se que a secreção de adrenocorticotrofina induzida pela grelina correlaciona-se com respostas de arginina-vasopressina, sabidamente liberados pelo PVH [176]. Uma vez que a liberação de grelina é uma resposta neuroendócrina à exposição ao estresse agudo [178] e a injeção de grelina induz ativação de várias áreas cerebrais relacionadas ao estresse [141], nós avaliamos recentemente o papel do eixo da grelina - GHS-R1a nas respostas cardiovasculares evocadas pela exposição ao estresse emocional agudo.

Grelina tem sido relacionada com a melhora da função cardíaca. Administração de grelina durante o período de reperfusão, em corações isolados de ratos, resultou em melhora do fluxo coronariano, frequência cardíaca e fração de ejeção ventricular [179]. Em adição, os dados do presente estudo demonstram que a injeção de grelina no PVH reduziu a pressão arterial e a contratilidade, sem modificar a cronotropia. É possível que os efeitos centrais da grelina dependam da potencialização dos mecanismos inibitórios gabaérgicos, enquanto nos tecidos periféricos, como nas células cardíacas, ela seria capaz de potencializar os mecanismos beta-adrenérgicos.

O GHS-R1a foi descrito como o principal receptor através do qual a grelina promove os seus efeitos integrativos sobre vários sistemas [180, 181]. As várias questões que ainda precisam ser respondidas em relação ao papel multissistêmico fisiológico da grelina impulsionarão os passos para estudos posteriores.

6 CONCLUSÃO

A grelina, ao interagir com seus receptores GHS-R1a no PVH, contribui para o controle autonômico da função cardíaca e da pressão arterial. Estes efeitos parecem resultar de interações com a neurotransmissão gabaérgica, ou seja, com o controle inibitório ao qual os neurônios pré-motores simpáticos dessa região estão submetidos. Esses achados estabelecem a viabilidade de novos estudos para melhor compreender os mecanismos eletrofisiológicos e moleculares neles envolvidos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dampney, R.A., *Central neural control of the cardiovascular system: current perspectives*. Adv Physiol Educ, 2016. **40**(3): p. 283-96.
2. Rahmouni, K., *Cardiovascular Regulation by the Arcuate Nucleus of the Hypothalamus: Neurocircuitry and Signaling Systems*. Hypertension, 2016. **67**(6): p. 1064-71.
3. da Silva, E.N., et al., *ATP in the lateral hypothalamus/perifornical area enhances the CO₂ chemoreflex control of breathing*. Exp Physiol, 2018. **103**(12): p. 1679-1691.
4. Kojima, M., et al., *Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach*. Nature, 1999. **402**(6762): p. 656-60.
5. Yanagi, S., et al., *The Homeostatic Force of Ghrelin*. Cell Metab, 2018. **27**(4): p. 786-804.
6. Callaghan, B., et al., *Hypotensive effects of ghrelin receptor agonists mediated through a novel receptor*. Br J Pharmacol, 2014. **171**(5): p. 1275-86.
7. Matsumura, K., et al., *Central ghrelin modulates sympathetic activity in conscious rabbits*. Hypertension, 2002. **40**(5): p. 694-9.
8. Vlasova, M.A., K. Jarvinen, and K.H. Herzig, *Cardiovascular effects of ghrelin antagonist in conscious rats*. Regul Pept, 2009. **156**(1-3): p. 72-6.
9. Coote, J., *Cardiovascular function of the paraventricular nucleus of the hypothalamus*. Neurosignals, 1995. **4**(3): p. 142-149.
10. Coote, J., *A role for the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the autonomic control of heart and kidney*. Experimental physiology, 2005. **90**(2): p. 169-173.
11. Kageyama, K., et al., *Ghrelin stimulates corticotropin-releasing factor and vasopressin gene expression in rat hypothalamic 4B cells*. Stress, 2011. **14**(5): p. 520-9.
12. Shrestha, Y.B., K. Wickwire, and S. Giraudo, *Effect of reducing hypothalamic ghrelin receptor gene expression on energy balance*. Peptides, 2009. **30**(7): p. 1336-41.
13. Schreihofer, A.M. and P.G. Guyenet, *The baroreflex and beyond: control of sympathetic vasomotor tone by GABAergic neurons in the ventrolateral medulla*. Clinical and experimental pharmacology and physiology, 2002. **29**(5-6): p. 514-521.
14. Bali, B. and K.J. Kovács, *GABAergic control of neuropeptide gene expression in parvocellular neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus*. European Journal of Neuroscience, 2003. **18**(6): p. 1518-1526.

15. Pyner, S., *Neurochemistry of the paraventricular nucleus of the hypothalamus: implications for cardiovascular regulation*. Journal of chemical neuroanatomy, 2009. **38**(3): p. 197-208.
16. Shafton, A.D., A. Ryan, and E. Badoer, *Neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus send collaterals to the spinal cord and to the rostral ventrolateral medulla in the rat*. Brain Research, 1998. **801**(1-2): p. 239-243.
17. Martin, D.S., T. Segura, and J.R. Haywood, *Cardiovascular responses to bicuculline in the paraventricular nucleus of the rat*. Hypertension, 1991. **18**(1): p. 48-55.
18. Sagawa, K., *Overall circulatory regulation*. Annu Rev Physiol, 1969. **31**: p. 295-330.
19. Dart, A.M., X.J. Du, and B.A. Kingwell, *Gender, sex hormones and autonomic nervous control of the cardiovascular system*. Cardiovasc Res, 2002. **53**(3): p. 678-87.
20. Freeman, J.V., et al., *Autonomic nervous system interaction with the cardiovascular system during exercise*. Prog Cardiovasc Dis, 2006. **48**(5): p. 342-62.
21. Wehrwein, E.A., H.S. Orer, and S.M. Barman, *Overview of the Anatomy, Physiology, and Pharmacology of the Autonomic Nervous System*. Compr Physiol, 2016. **6**(3): p. 1239-78.
22. Ziegler, D., et al., *Assessment of cardiovascular autonomic function: age-related normal ranges and reproducibility of spectral analysis, vector analysis, and standard tests of heart rate variation and blood pressure responses*. Diabet Med, 1992. **9**(2): p. 166-75.
23. Japundzic, N., et al., *Spectral analysis of blood pressure and heart rate in conscious rats: effects of autonomic blockers*. J Auton Nerv Syst, 1990. **30**(2): p. 91-100.
24. Levy, M.N., *Sympathetic-parasympathetic interactions in the heart*. Circ Res, 1971. **29**(5): p. 437-45.
25. Pinol, R.A., et al., *Brs3 neurons in the mouse dorsomedial hypothalamus regulate body temperature, energy expenditure, and heart rate, but not food intake*. Nat Neurosci, 2018. **21**(11): p. 1530-1540.
26. Carter, J.R. and D.S. Goldstein, *Sympathoneural and adrenomedullary responses to mental stress*. Compr Physiol, 2015. **5**(1): p. 119-46.
27. Robinson, B.F., et al., *Control of heart rate by the autonomic nervous system. Studies in man on the interrelation between baroreceptor mechanisms and exercise*. Circ Res, 1966. **19**(2): p. 400-11.
28. Joho, S., et al., *Sympathetic Nerve Activity Efferent Drive and Beta-Blocker Treatment- Effect of Interaction in Systolic Heart Failure*. Circ J, 2016. **80**(10): p. 2149-54.

29. Gigante, A., et al., *Heart rate variability in nephrotic syndrome: Role of sympathetic and parasympathetic system*. Eur J Intern Med, 2018. **54**: p. e21-e22.
30. Waldenstrom, A., et al., *Parasympathetic muscarinic stimulation limits noradrenaline induced myocardial creatine kinase release: a study in the isolated perfused working rat heart*. Scand J Clin Lab Invest, 1994. **54**(8): p. 615-21.
31. Thayer, J.F., S.S. Yamamoto, and J.F. Brosschot, *The relationship of autonomic imbalance, heart rate variability and cardiovascular disease risk factors*. Int J Cardiol, 2010. **141**(2): p. 122-31.
32. Konstam, M.A., et al., *Impact of Autonomic Regulation Therapy in Patients with Heart Failure: ANTHEM-HFrEF Pivotal Study Design*. Circ Heart Fail, 2019. **12**(11): p. e005879.
33. Shah, A.S., et al., *Heart Rate Variability and Cardiac Autonomic Dysfunction: Prevalence, Risk Factors, and Relationship to Arterial Stiffness in the Treatment Options for Type 2 Diabetes in Adolescents and Youth (TODAY) Study*. Diabetes Care, 2019. **42**(11): p. 2143-2150.
34. Young, M.A., D.R. Knight, and S.F. Vatner, *Autonomic control of large coronary arteries and resistance vessels*. Prog Cardiovasc Dis, 1987. **30**(3): p. 211-34.
35. Di Carli, M.F., et al., *Effects of cardiac sympathetic innervation on coronary blood flow*. N Engl J Med, 1997. **336**(17): p. 1208-15.
36. Cavalli, A., et al., *Decreased blood pressure response in mice deficient of the $\alpha 1b$ -adrenergic receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(21): p. 11589-94.
37. Macefield, V.G. and L.A. Henderson, *Identification of the human sympathetic connectome involved in blood pressure regulation*. Neuroimage, 2019. **202**: p. 116119.
38. Hart, E.C. and N. Charkoudian, *Sympathetic neural regulation of blood pressure: influences of sex and aging*. Physiology (Bethesda), 2014. **29**(1): p. 8-15.
39. Dampney, R., *Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system*. Physiological reviews, 1994. **74**(2): p. 323-364.
40. Klugman, K., G. Mitchell, and C. Rosendorff, *Evidence for an indirect cholinergic regulation of blood flow in the hypothalamus of conscious rabbits*. Br J Pharmacol, 1979. **66**(2): p. 217-21.
41. Rivest, S., et al., *How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli*. Proc Soc Exp Biol Med, 2000. **223**(1): p. 22-38.

42. Ciofi, P., et al., *Brain-endocrine interactions: a microvascular route in the mediobasal hypothalamus*. Endocrinology, 2009. **150**(12): p. 5509-19.
43. King, B.M., *The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight*. Physiol Behav, 2006. **87**(2): p. 221-44.
44. Cedernaes, J., N. Waldeck, and J. Bass, *Neurogenetic basis for circadian regulation of metabolism by the hypothalamus*. Genes Dev, 2019. **33**(17-18): p. 1136-1158.
45. Lang, J., *Surgical anatomy of the hypothalamus*. Acta Neurochir (Wien), 1985. **75**(1-4): p. 5-22.
46. Giardino, W.J., et al., *Parallel circuits from the bed nuclei of stria terminalis to the lateral hypothalamus drive opposing emotional states*. Nat Neurosci, 2018. **21**(8): p. 1084-1095.
47. Hubbard, J., J. Sibbald, and N. Sirett, *Stimulation of the subcallosal fornix excites neurones in the cat preoptic region which project to the medial basal hypothalamus and in the medial forebrain bundle*. Brain research, 1990. **509**(1): p. 175-179.
48. Arees, E.A. and J. Mayer, *Anatomical connections between medial and lateral regions of the hypothalamus concerned with food intake*. Science, 1967. **157**(3796): p. 1574-5.
49. Li, P., et al., *Sleeve Gastrectomy Rescuing the Altered Functional Connectivity of Lateral but Not Medial Hypothalamus in Subjects with Obesity*. Obes Surg, 2019. **29**(7): p. 2191-2199.
50. Morgane, P.J., *Medial forebrain bundle and "feeding centers" of the hypothalamus*. J Comp Neurol, 1961. **117**: p. 1-25.
51. Uribe-Marino, A., et al., *The alpha- and beta-noradrenergic receptors blockade in the dorsal raphe nucleus impairs the panic-like response elaborated by medial hypothalamus neurons*. Brain Res, 2019. **1725**: p. 146468.
52. Elias, C.F., et al., *Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area*. Journal of comparative neurology, 1998. **402**(4): p. 442-459.
53. Cumming, P., et al., *The effect of unilateral neurotoxic lesions to serotonin fibres in the medial forebrain bundle on the metabolism of [3H] DOPA in the telencephalon of the living rat*. Brain research, 1997. **747**(1): p. 60-69.
54. Perkins, E., P.J. May, and S. Warren, *Feed-forward and feedback projections of midbrain reticular formation neurons in the cat*. Front Neuroanat, 2014. **7**: p. 55.

55. Qualls-Creekmore, E. and H. Munzberg, *Modulation of Feeding and Associated Behaviors by Lateral Hypothalamic Circuits*. Endocrinology, 2018. **159**(11): p. 3631-3642.
56. Rossi, M.A., et al., *Obesity remodels activity and transcriptional state of a lateral hypothalamic brake on feeding*. Science, 2019. **364**(6447): p. 1271-1274.
57. Hsu, T.M., et al., *Hippocampus ghrelin signaling mediates appetite through lateral hypothalamic orexin pathways*. Elife, 2015. **4**.
58. Luan, X., et al., *Lateral hypothalamic Orexin-A-ergic projections to the arcuate nucleus modulate gastric function in vivo*. J Neurochem, 2017. **143**(6): p. 697-707.
59. Luiten, P.G., et al., *The course of paraventricular hypothalamic efferents to autonomic structures in medulla and spinal cord*. Brain Res, 1985. **329**(1-2): p. 374-8.
60. Cechetto, D.F. and C.B. Saper, *Neurochemical organization of the hypothalamic projection to the spinal cord in the rat*. J Comp Neurol, 1988. **272**(4): p. 579-604.
61. van den Pol, A.N., *The magnocellular and parvocellular paraventricular nucleus of rat: intrinsic organization*. J Comp Neurol, 1982. **206**(4): p. 317-45.
62. Roy, R.K., et al., *Acute myocardial infarction activates magnocellular vasopressin and oxytocin neurones*. Journal of Neuroendocrinology, 2019. **31**(12): p. 10.
63. Hicks, A.I., et al., *Effects of salt loading on the organisation of microtubules in rat magnocellular vasopressin neurones*. Journal of Neuroendocrinology: p. 9.
64. Johnson, C.S., J.S. Bains, and A.G. Watts, *Neurotransmitter diversity in pre-synaptic terminals located in the parvicellular neuroendocrine paraventricular nucleus of the rat and mouse hypothalamus*. Journal of Comparative Neurology, 2018. **526**(8): p. 1287-1306.
65. Cano, G., et al., *Anatomical substrates for the central control of sympathetic outflow to interscapular adipose tissue during cold exposure*. Journal of Comparative Neurology, 2003. **460**(3): p. 303-326.
66. Sawchenko, P.E., *Evidence for differential regulation of corticotropin-releasing factor and vasopressin immunoreactivities in parvocellular neurosecretory and autonomic-related projections of the paraventricular nucleus*. Brain Res, 1987. **437**(2): p. 253-63.
67. Ter Horst, G.J., et al., *Projections from the rostral parvocellular reticular formation to pontine and medullary nuclei in the rat: involvement in autonomic regulation and orofacial motor control*. Neuroscience, 1991. **40**(3): p. 735-58.
68. da Silva, A.Q.G., et al., *Cardiovascular responses evoked by activation or blockade of GABAA receptors in the hypothalamic PVN are attenuated in transgenic rats with low brain angiotensinogen*. Brain research, 2012. **1448**: p. 101-110.

69. Swanson, L.W. and H.G. Kuypers, *The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods*. J Comp Neurol, 1980. **194**(3): p. 555-70.
70. Soriano, J.E., et al., *The sympathetic role of glutamatergic paraventricular nucleus neurons in blood pressure regulation*. Journal of Physiology-London, 2019. **597**(6): p. 1433-1434.
71. Wang, M.L., et al., *Blockade of TLR4 Within the Paraventricular Nucleus Attenuates Blood Pressure by Regulating ROS and Inflammatory Cytokines in Prehypertensive Rats*. American Journal of Hypertension, 2018. **31**(9): p. 1013-1023.
72. Becker, B.K., *Shining light on the paraventricular nucleus: the role of glutamatergic PVN neurons in blood pressure control*. Journal of Physiology-London, 2018. **596**(24): p. 6127-6128.
73. Stocker, S.D., K.J. Keith, and G.M. Toney, *Acute inhibition of the hypothalamic paraventricular nucleus decreases renal sympathetic nerve activity and arterial blood pressure in water-deprived rats*. American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology, 2004. **286**(4): p. R719-R725.
74. Yu, G.L. and B.M. Sharp, *Nicotine modulates multiple regions in the limbic stress network regulating activation of hypophysiotrophic neurons in hypothalamic paraventricular nucleus*. Journal of Neurochemistry, 2012. **122**(3): p. 628-640.
75. Radley, J.J. and P.E. Sawchenko, *Evidence for Involvement of a Limbic Paraventricular Hypothalamic Inhibitory Network in Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Adaptations to Repeated Stress*. Journal of Comparative Neurology, 2015. **523**(18): p. 2769-2787.
76. Li, Y.F. and K.P. Patel, *Paraventricular nucleus of the hypothalamus and elevated sympathetic activity in heart failure: the altered inhibitory mechanisms*. Acta Physiologica Scandinavica, 2003. **177**(1): p. 17-26.
77. Allen, A.M., *Inhibition of the hypothalamic paraventricular nucleus in spontaneously hypertensive rats dramatically reduces sympathetic vasomotor tone*. Hypertension, 2002. **39**(2): p. 275-280.
78. Ciriello, J., et al., *Lesions of the paraventricular nucleus alter the development of spontaneous hypertension in the rat*. Brain Res, 1984. **310**(2): p. 355-9.

79. Chen, F., et al., *Role of the hypothalamic PVN in the reflex reduction in mesenteric blood flow elicited by hyperthermia*. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2008. **295**(6): p. R1874-R1881.
80. Zhu, G.Q., et al., *ANG II in the paraventricular nucleus potentiates the cardiac sympathetic afferent reflex in rats with heart failure*. Journal of Applied Physiology, 2004. **97**(5): p. 1746-1754.
81. Dampney, R., et al., *Long-term regulation of arterial blood pressure by hypothalamic nuclei: some critical questions*. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2005. **32**(5-6): p. 419-425.
82. Herman, J.P., et al., *Local circuit regulation of paraventricular nucleus stress integration - Glutamate-GABA connections*. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2002. **71**(3): p. 457-468.
83. Harding, J.W. and D. Felix, *Angiotensin-sensitive neurons in the rat paraventricular nucleus: relative potencies of angiotensin II and angiotensin III*. Brain Res, 1987. **410**(1): p. 130-4.
84. Ferrendelli, J.A., M.M. Chang, and D.A. Kinscherf, *Elevation of cyclic GMP levels in central nervous system by excitatory and inhibitory amino acids*. J Neurochem, 1974. **22**(4): p. 535-40.
85. Monaghan, D.T., R.J. Bridges, and C.W. Cotman, *The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1989. **29**: p. 365-402.
86. Mayer, M.L. and G.L. Westbrook, *The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system*. Prog Neurobiol, 1987. **28**(3): p. 197-276.
87. Chen, C.R., et al., *The Roles of GABA in Ischemia-Reperfusion Injury in the Central Nervous System and Peripheral Organs*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2019. **2019**: p. 19.
88. Sivilotti, L. and A. Nistri, *GABA receptor mechanisms in the central nervous system*. Prog Neurobiol, 1991. **36**(1): p. 35-92.
89. Mei, X., X.L. Xu, and Z.Y. Yang, *Characterization of two tea glutamate decarboxylase isoforms involved in GABA production*. Food Chemistry, 2020. **305**: p. 9.
90. Bowery, N.G., *GABAB receptor pharmacology*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1993. **33**: p. 109-47.

91. Hartmann, K., et al., *Ionotropic GABA receptors with mixed pharmacological properties of GABA(A) and GABA(C) receptors*. European Journal of Pharmacology, 2004. **497**(2): p. 139-146.
92. Takahashi, T., Y. Kajikawa, and T. Tsujimoto, *G-protein-coupled modulation of presynaptic calcium currents and transmitter release by a GABA(B) receptor*. Journal of Neuroscience, 1998. **18**(9): p. 3138-3146.
93. Andrade, R., R.C. Malenka, and R.A. Nicoll, *A G protein couples serotonin and GABAB receptors to the same channels in hippocampus*. Science, 1986. **234**(4781): p. 1261-5.
94. Yang, X.X., et al., *Prepubertal overexposure to manganese induce precocious puberty through GABA(A) receptor/nitric oxide pathway in immature female rats*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2020. **188**: p. 10.
95. Beaumont, K., et al., *Muscimol binding in rat brain: association with synaptic GABA receptors*. Brain Res, 1978. **148**(1): p. 153-62.
96. Burt, D.R. and G.L. Kamatchi, *GABAA receptor subtypes: from pharmacology to molecular biology*. FASEB J, 1991. **5**(14): p. 2916-23.
97. Carillo, B., et al., *Changes in GABAergic inputs in the paraventricular nucleus maintain sympathetic vasomotor tone in chronic heart failure*. Autonomic Neuroscience, 2012. **171**(1-2): p. 41-48.
98. Wang, R.J., et al., *GABA(A) and GABA(B) receptor-mediated inhibition of sympathetic outflow in the paraventricular nucleus is blunted in chronic heart failure*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2009. **36**(5-6): p. 516-22.
99. Cardinale, J.P., et al., *Angiotensin II-Induced Hypertension Is Modulated by Nuclear Factor-kappa B in the Paraventricular Nucleus*. Hypertension, 2012. **59**(1): p. 113-U282.
100. Antonaccio, M.J., L. Kerwin, and D.G. Taylor, *Reductions in blood pressure, heart rate and renal sympathetic nerve discharge in cats after the central administration of muscimol, a GABA agonist*. Neuropharmacology, 1978. **17**(10): p. 783-91.
101. Xu, Y. and T.L. Krukoff, *Decrease in arterial pressure induced by adrenomedullin in the hypothalamic paraventricular nucleus is mediated by nitric oxide and GABA*. Regulatory Peptides, 2004. **119**(1-2): p. 21-30.
102. Martins-Pinge, M.C., et al., *Regulation of arterial pressure by the paraventricular nucleus in conscious rats: interactions among glutamate, GABA, and nitric oxide*. Frontiers in Physiology, 2013. **3**: p. 11.

103. Nunn, N., et al., *Function and Pharmacology of Spinally-Projecting Sympathetic Pre-Autonomic Neurones in the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus*. Current Neuropharmacology, 2011. **9**(2): p. 262-277.
104. Olsen, R.W. and W. Sieghart, *GABA(A) receptors: Subtypes provide diversity of function and pharmacology*. Neuropharmacology, 2009. **56**(1): p. 141-148.
105. Swanson, L.W. and D.M. Simmons, *Differential steroid hormone and neural influences on peptide mRNA levels in CRH cells of the paraventricular nucleus: a hybridization histochemical study in the rat*. J Comp Neurol, 1989. **285**(4): p. 413-35.
106. Olszewski, P.K., et al., *Hypothalamic paraventricular injections of ghrelin: effect on feeding and c-Fos immunoreactivity*. Peptides, 2003. **24**(6): p. 919-923.
107. Kojima, M., et al., *Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach*. Nature, 1999. **402**(6762): p. 656-660.
108. Rosicka, M., et al., *Ghrelin - a new endogenous growth hormone secretagogue*. Physiological Research, 2002. **51**(5): p. 435-441.
109. Kojima, M., et al., *Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor*. Trends in Endocrinology and Metabolism, 2001. **12**(3): p. 118-122.
110. Wren, A.M., et al., *Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2001. **86**(12): p. 5992-5995.
111. Pinkney, J. and G. Williams, *Ghrelin gets hungry*. Lancet, 2002. **359**(9315): p. 1360-1361.
112. Castaneda, T.R., et al., *Ghrelin in the regulation of body weight and metabolism*. Frontiers in Neuroendocrinology, 2010. **31**(1): p. 44-60.
113. Wren, A.M., et al., *The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion*. Endocrinology, 2000. **141**(11): p. 4325-4328.
114. Carlini, V.P., et al., *Ghrelin increases anxiety-like behavior and memory retention in rats*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002. **299**(5): p. 739-743.
115. Tolle, V., et al., *Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behavior, and sleep-wake patterns in rats*. Endocrinology, 2002. **143**(4): p. 1353-1361.
116. Nishi, Y., et al., *Structures and molecular forms of the ghrelin-family peptides*. Peptides, 2011. **32**(11): p. 2175-82.

117. Ando, T., et al., *Plasma ghrelin isoforms and gastric ghrelin O-acyltransferase expression are influenced by Helicobacter pylori status*. Nutrition, 2012. **28**(10): p. 967-72.
118. Hosoda, H., et al., *Purification and characterization of rat des-Gln14-Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(29): p. 21995-22000.
119. Al Massadi, O., M.H. Tschoop, and J. Tong, *Ghrelin acylation and metabolic control*. Peptides, 2011. **32**(11): p. 2301-2308.
120. Shintani, M., et al., *Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway*. Diabetes, 2001. **50**(2): p. 227-232.
121. Wang, L., et al., *Ghrelin stimulates angiogenesis via GHSR1a-dependent MEK/ERK and PI3K/Akt signal pathways in rat cardiac microvascular endothelial cells*. Peptides, 2012. **33**(1): p. 92-100.
122. Van Der Lely, A.J., et al., *Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin*. Endocrine reviews, 2004. **25**(3): p. 426-457.
123. Kamegai, J., et al., *Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats*. Diabetes, 2001. **50**(11): p. 2438-2443.
124. Kojima, M. and K. Kangawa, *Ghrelin: Structure and function*. Physiological Reviews, 2005. **85**(2): p. 495-522.
125. Freeman, J.N., et al., *Chronic central ghrelin infusion reduces blood pressure and heart rate despite increasing appetite and promoting weight gain in normotensive and hypertensive rats*. Peptides, 2013. **42**: p. 35-42.
126. Matsumura, K., et al., *Central ghrelin modulates sympathetic activity in conscious rabbits*. Hypertension, 2002. **40**(5): p. 694-699.
127. Soeki, T., et al., *Ghrelin suppresses cardiac sympathetic activity and prevents early left ventricular remodeling in rats with myocardial infarction*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2008. **294**(1): p. H426-H432.
128. Cabral, A., et al., *Circulating Ghrelin Acts on GABA Neurons of the Area Postrema and Mediates Gastric Emptying in Male Mice*. Endocrinology, 2017. **158**(5): p. 1436-1449.
129. Cruz, M.T., et al., *Ghrelin increases GABAergic transmission and interacts with ethanol actions in the rat central nucleus of the amygdala*. Neuropsychopharmacology, 2013. **38**(2): p. 364-375.

130. Gastón, M.S., M.P. Cid, and N.A. Salvatierra, *Bicuculline, a GABAA-receptor antagonist, blocked HPA axis activation induced by ghrelin under an acute stress*. Behavioural brain research, 2017. **320**: p. 464-472.
131. Health, U.D.o. and H. Services, *National Institutes of Health Guide of the care and use of laboratory animals*. 1986, NIH Publication.
132. Paxinos, G. and C. Watson, *The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition*. 2006: Elsevier.
133. Allen, A.M., *Inhibition of the hypothalamic paraventricular nucleus in spontaneously hypertensive rats dramatically reduces sympathetic vasomotor tone*. Hypertension, 2002. **39**(2): p. 275-80.
134. Kojima, M. and K. Kangawa, *Ghrelin: structure and function*. Physiol Rev, 2005. **85**(2): p. 495-522.
135. Bali, A. and A.S. Jaggi, *An Integrative Review on Role and Mechanisms of Ghrelin in Stress, Anxiety and Depression*. Curr Drug Targets, 2016. **17**(5): p. 495-507.
136. Auclair, N., et al., *Acylated Ghrelin and The Regulation of Lipid Metabolism in The Intestine*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 17975.
137. Deaver, S.E., et al., *Localization of ghrelin and its receptor in the reproductive tract of Holstein heifers*. J Dairy Sci, 2013. **96**(1): p. 150-7.
138. Ueberberg, B., et al., *Differential expression of ghrelin and its receptor (GHS-R1a) in various adrenal tumors and normal adrenal gland*. Horm Metab Res, 2008. **40**(3): p. 181-8.
139. Yang, C.Y. and P. Yang, *Ghrelin partially protects against heart failure after myocardial infarction by increasing the Bcl-2/Bax ratio in a GHS-R1a-dependent manner*. Journal of the American College of Cardiology, 2018. **72**(16): p. C49-C49.
140. Harrold, J.A., et al., *Autoradiographic analysis of ghrelin receptors in the rat hypothalamus*. Brain Res, 2008. **1196**: p. 59-64.
141. Andrews, Z.B., *The extra-hypothalamic actions of ghrelin on neuronal function*. Trends Neurosci, 2011. **34**(1): p. 31-40.
142. Zigman, J.M., et al., *Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain*. J Comp Neurol, 2006. **494**(3): p. 528-48.
143. Howell, E., et al., *Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) and 5-Hydroxytryptamine 2c (5-HT2c) Receptor Agonists in the Ventral Tegmental Area (VTA) Inhibit Ghrelin-Stimulated Appetitive Reward*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(4).

144. Bowers, C.Y., *History to the discovery of ghrelin*. Methods Enzymol, 2012. **514**: p. 3-32.
145. Russo, C., et al., *Ghrelin-containing neurons in the olfactory bulb send collateralized projections into medial amygdaloid and arcuate hypothalamic nuclei: neuroanatomical study*. Exp Brain Res, 2018. **236**(8): p. 2223-2229.
146. Russo, C., et al., *Hippocampal Ghrelin-positive neurons directly project to arcuate hypothalamic and medial amygdaloid nuclei. Could they modulate food-intake?* Neurosci Lett, 2017. **653**: p. 126-131.
147. Cruz, M.T., et al., *Ghrelin increases GABAergic transmission and interacts with ethanol actions in the rat central nucleus of the amygdala*. Neuropsychopharmacology, 2013. **38**(2): p. 364-75.
148. Alvarez-Crespo, M., et al., *The amygdala as a neurobiological target for ghrelin in rats: neuroanatomical, electrophysiological and behavioral evidence*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e46321.
149. Camargo-Silva, G., et al., *Ghrelin potentiates cardiac reactivity to stress by modulating sympathetic control and beta-adrenergic response*. Life Sci, 2018. **196**: p. 84-92.
150. Carlini, V.P., et al., *Differential role of the hippocampus, amygdala, and dorsal raphe nucleus in regulating feeding, memory, and anxiety-like behavioral responses to ghrelin*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **313**(3): p. 635-41.
151. Lin, Y., et al., *Ghrelin acts at the nucleus of the solitary tract to decrease arterial pressure in rats*. Hypertension, 2004. **43**(5): p. 977-82.
152. Decavel, C. and A.N. Van den Pol, *GABA: a dominant neurotransmitter in the hypothalamus*. J Comp Neurol, 1990. **302**(4): p. 1019-37.
153. Li, Y.F., et al., *Interaction between glutamate and GABA systems in the integration of sympathetic outflow by the paraventricular nucleus of the hypothalamus*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(6): p. H2847-56.
154. Vatner, S.F., C.B. Higgins, and E. Braunwald, *Sympathetic and parasympathetic components of reflex tachycardia induced by hypotension in conscious dogs with and without heart failure*. Cardiovasc Res, 1974. **8**(2): p. 153-61.
155. Xu, Y. and T.L. Krukoff, *Decrease in arterial pressure induced by adrenomedullin in the hypothalamic paraventricular nucleus is mediated by nitric oxide and GABA*. Regul Pept, 2004. **119**(1-2): p. 21-30.

156. Martins-Pinge, M.C., et al., *Regulation of arterial pressure by the paraventricular nucleus in conscious rats: interactions among glutamate, GABA, and nitric oxide*. Front Physiol, 2012. **3**: p. 490.
157. Sessler, F.M., E.J. Mah, and S.M. Grady, *Alterations in noradrenergic physiological characteristics with DOCA-hypertension: interaction between norepinephrine and GABA in rat lateral hypothalamus*. Brain Res, 1993. **613**(2): p. 259-68.
158. Beverly, J.L., et al., *Norepinephrine mediates glucoprivic-induced increase in GABA in the ventromedial hypothalamus of rats*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000. **279**(3): p. R990-6.
159. Ohtani, N., T. Sugano, and M. Ohta, *Alterations in monoamines and GABA in the ventromedial and paraventricular nuclei of the hypothalamus following cold exposure: a reduction in noradrenaline induces hyperphagia*. Brain Res, 1999. **842**(1): p. 6-14.
160. Daftary, S.S., C. Boudaba, and J.G. Tasker, *Noradrenergic regulation of parvocellular neurons in the rat hypothalamic paraventricular nucleus*. Neuroscience, 2000. **96**(4): p. 743-51.
161. Navarro, C.E., R.J. Cabrera, and A.O. Donoso, *Interaction between glutamate and GABA on 3H-noradrenaline release from rat hypothalamus*. Brain Res Bull, 1995. **37**(2): p. 119-22.
162. Scopinho, A.A., et al., *Non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in the paraventricular nucleus of hypothalamus mediate the pressor response evoked by noradrenaline microinjected into the lateral septal area in rats*. J Neurosci Res, 2008. **86**(14): p. 3203-11.
163. Busnardo, C., et al., *Ionotropic glutamate receptors in hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei mediate vasopressin and oxytocin release in unanesthetized rats*. Endocrinology, 2012. **153**(5): p. 2323-31.
164. Guyenet, P.G., *The sympathetic control of blood pressure*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(5): p. 335-46.
165. Patel, K.P. and P.G. Schmid, *Role of paraventricular nucleus (PVH) in baroreflex-mediated changes in lumbar sympathetic nerve activity and heart rate*. J Auton Nerv Syst, 1988. **22**(3): p. 211-9.
166. Horn, T., et al., *Nitric oxide actions in paraventricular nucleus: cardiovascular and neurochemical implications*. Am J Physiol, 1994. **266**(1 Pt 2): p. R306-13.

167. Pyner, S., *Neurochemistry of the paraventricular nucleus of the hypothalamus: implications for cardiovascular regulation*. J Chem Neuroanat, 2009. **38**(3): p. 197-208.
168. Aicher, S.A., et al., *Anatomical substrates for baroreflex sympathoinhibition in the rat*. Brain Res Bull, 2000. **51**(2): p. 107-10.
169. Tokudome, T. and K. Kangawa, *Physiological significance of ghrelin in the cardiovascular system*. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2019. **95**(8): p. 459-467.
170. Stocker, S.D., K.J. Keith, and G.M. Toney, *Acute inhibition of the hypothalamic paraventricular nucleus decreases renal sympathetic nerve activity and arterial blood pressure in water-deprived rats*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004. **286**(4): p. R719-25.
171. Akine, A., M. Montanaro, and A.M. Allen, *Hypothalamic paraventricular nucleus inhibition decreases renal sympathetic nerve activity in hypertensive and normotensive rats*. Auton Neurosci, 2003. **108**(1-2): p. 17-21.
172. Zhu, G.Q., et al., *ANG II in the paraventricular nucleus potentiates the cardiac sympathetic afferent reflex in rats with heart failure*. J Appl Physiol (1985), 2004. **97**(5): p. 1746-54.
173. Soares, J.B., et al., *Inotropic and lusitropic effects of ghrelin and their modulation by the endocardial endothelium, NO, prostaglandins, GHS-R1a and KCa channels*. Peptides, 2006. **27**(7): p. 1616-23.
174. Cao, J.M., H. Ong, and C. Chen, *Effects of ghrelin and synthetic GH secretagogues on the cardiovascular system*. Trends Endocrinol Metab, 2006. **17**(1): p. 13-8.
175. Gaston, M.S., M.P. Cid, and N.A. Salvatierra, *Bicuculline, a GABAA-receptor antagonist, blocked HPA axis activation induced by ghrelin under an acute stress*. Behav Brain Res, 2017. **320**: p. 464-472.
176. Coiro, V., et al., *Adrenocorticotropin/cortisol and arginine-vasopressin secretory patterns in response to ghrelin in normal men*. Neuroendocrinology, 2005. **81**(2): p. 103-6.
177. Martinez-Fuentes, A.J., et al., *Ghrelin is produced by and directly activates corticotrope cells from adrenocorticotropin-secreting adenomas*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(6): p. 2225-31.
178. Spencer, S.J., et al., *Ghrelin regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and restricts anxiety after acute stress*. Biol Psychiatry, 2012. **72**(6): p. 457-65.
179. Chang, L., et al., *Protective effects of ghrelin on ischemia/reperfusion injury in the isolated rat heart*. J Cardiovasc Pharmacol, 2004. **43**(2): p. 165-70.

180. Edwards, A. and A. Abizaid, *Clarifying the Ghrelin System's Ability to Regulate Feeding Behaviours Despite Enigmatic Spatial Separation of the GHSR and Its Endogenous Ligand*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(4).
181. Delhanty, P.J., et al., *Ghrelin and unacylated ghrelin stimulate human osteoblast growth via mitogen-activated protein kinase (MAPK)/phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathways in the absence of GHS-R1a*. J Endocrinol, 2006. **188**(1): p. 37-47.

8 ANEXOS

8.1 Anexo I: CONTROL OF CARDIAC FUNCTION BY GHRELIN IN THE PARAVENTRICULAR HYPOTHALAMUS. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research. Submitted*

Brazilian Journal

of medical and biological research

CONTROL OF CARDIAC FUNCTION BY GHRELIN IN THE PARAVENTRICULAR HYPOTHALAMUS

Journal:	<i>Brazilian Journal of Medical and Biological Research</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Full Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Santana, Joice; Universidade Federal de Goiás - Campus Samambaia Mendonça, Michelle; Universidade Federal de Goiás. Instituto de Ciências Biológicas., Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia e Farmacologia) da Silva, Elder; Universidade Federal de Goiás - Campus Samambaia da Cruz, Kellen; Universidade Federal de Goiás. Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia e Farmacologia) Ianzer, Danielle ; Universidade Federal de Goiás - Campus Samambaia Resstel, Leonardo ; Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, Escola de Medicina Fontes, Marco Antônio; Universidade Federal de Minas Gerais Pedrino, Gustavo; Universidade Federal de Goiás - Campus Samambaia, Physiological Science Ferreira, Reginaldo; Universidade Federal de Goiás - Campus Samambaia Xavier, Carlos; Universidade Federal de Goiás, Ciências Fisiológicas. Laboratório de Fisiologia e Terapêutica Cardiovascular
Keywords:	Paraventricular hypothalamus, cardiac function, ghrelin, autonomic nervous system, ghrelin receptors
Special Sections:	Biomedical Sciences/Physiology and Biophysics

SCHOLARONE™
Manuscripts

**CONTROL OF CARDIAC FUNCTION BY GHRELIN IN THE PARAVENTRICULAR
HYPOTHALAMUS**

Running title: Role of ghrelin in the control of cardiac function by PVH

¹Joice Simões Santana⁺, ¹Michelle Mendanha Mendonça⁺, ¹Elder Sales da Silva, ¹Kellen Rosa
da Cruz, ¹Danielle Ianzer, ²Leonardo Resstel, ³Marco A.P. Fontes, ¹Gustavo Rodrigues Pedrino,
¹Reginaldo Nassar Ferreira, ¹Carlos Henrique Xavier*

- 1- Department of Physiology. Institute of Biological Sciences, room 224. Federal
University of Goiás. Goiânia-GO. Brazil. 74690-900.
- 2- Department of Pharmacology. Faculty of Medicine. University of Sao Paulo. Ribeirão
Preto – SP. Brazil. 14049-900.
- 3- Department of Physiology and Biophysics. Institute of Biological Sciences. Federal
University of Minas Gerais. Belo Horizonte – MG. Brazil. 31270-901

+ These two authors contributed equally to this work

* **Corresponding author:** Carlos Henrique Xavier, MSc. PhD. – Associate Professor
Department of Physiological Sciences. Institute of Biological Sciences, room 224. Federal
University of Goiás. Goiânia-GO. Brazil. 74690-900. +55 62 35211113 carlosxavier@ufg.br

ABSTRACT

BACKGROUND – The action of hormones and neurotransmitters upon hypothalamus is responsible for producing adequate responses that result from autonomic settings. The effects of the 28-amino acid peptide ghrelin are mediated by the growth hormone secretagogue receptor subtype 1a (GHSR1a), densely expressed in the sympathetic premotor of neurons located at the paraventricular hypothalamus well known for controlling cardiovascular system. **AIMS** – We investigated whether: i) ghrelin and its receptors of PVH would be responsible for setting cardiac function; ii) activity of gabaergic synapses that act upon would be influenced by ghrelin. **METHODS** – Wistar rats (250-300g) were anesthetized (1.4 g/kg i.p.). Polyethylene catheters were placed into the femoral artery and vein for recordings mean arterial pressure (MAP) and for drug injections, respectively. Left ventricle was catheterized to measure pressure (LVP). Drugs injected into PVH were: i) Ghrelin (0.03 nM/100 nL); ii) the antagonist of GHS-R1a PF04628935 (0.06 nM/100 nL); iii) the agonist of GABA_A receptors Muscimol (20 mM/100 nL) followed by Ghrelin (0.03 nM/100 nL). **RESULTS** – Ghrelin in the PVH decreased MAP, maximal LVP (LVP_{max}) and its derivative (LVdP/dT peak, a measure of contractility). Converse, blockade of the endogenous ghrelin by the antagonism of GHS-R1a in the paraventricular hypothalamus increased arterial and cardiac pressures, besides provoking positive cardiac chronotropy and inotropy. Ghrelin potentiated the hypotensive effect evoked by muscimol into PVH. **CONCLUSION** – Ghrelin seem to reduce cardiac function through GHS-R1a receptors. These ghrelin effect in the PVH upon vasomotion seem to be potentiated by gabaergic tone.

Keywords: Paraventricular hypothalamus, cardiac function, ghrelin, autonomic nervous system.

1- INTRODUCTION

Among the central pathways controlling cardiovascular, respiratory and neuroendocrine functions, hypothalamus plays a pivotal role [1-3]. Within the main diencephalic areas importantly involved in the autonomic regulation of cardiovascular and renal functions, paraventricular hypothalamus (PVH) is known for governing vasomotion, cardiac and renal beds [4], by regulating neuroendocrine functions [2] and by modulating the activity of sympathetic supplies [5, 6]. PVH contains sympathetic premotor neurons that relay directly at different levels of the intermediolateral column of the spinal cord, including those levels containing preganglionic neurons that connect to sympathetic efferences innervating heart and vessels [7].

The action of hormones and neurotransmitters upon hypothalamus is responsible for producing adequate responses that result from autonomic settings [8]. Despite being firstly described for controlling metabolism and food intake, the 28-amino acid peptide ghrelin is able to act in central areas involved in the autonomic control [9]. Recently, ghrelin was described for influencing cardiovascular system, as revealed by the hypotensive and bradycardic effects that were mediated by the growth hormone secretagogue receptor subtype 1a (GHS-R1a) [10]. This receptor is densely expressed in the sympathetic premotor of neurons of PVH that are modulated by gabaergic inhibitory inputs [11, 12], well known for their role in the control of body fluid homeostasis and cardiovascular functions [13-15].

Besides being synthesized and secreted in some brain areas, ghrelin is able to across the blood brain barrier through many mechanisms [10, 16]. Diencephalic regions are almost devoid of blood brain barrier which allows systemically circulating molecules achieving this highly permeable brain region [17]. In the regard of these evidences, it has been described that intraperitoneal injection of ghrelin induces PVH expression of c-Fos, an early gene that correlates with recent neuronal activity. Direct injection of ghrelin in the paraventricular

hypothalamus was described for modifying behavior [18], intestinal motility [4, 19] and blood pressure [4, 8]. However, to the best of our knowledge, there is no report showing the involvement of ghrelin and its receptors in the PVH on the control of cardiac function [8]. Since PVH is one of the sympathetic premotor groups whose neurons express GHS-R1a [20-22], the hypotheses then raised are: i) ghrelin and these receptors would be responsible for setting cardiac function; ii) the activity of gabaergic synapses would be influenced in the presence of ghrelin and/or during activation of ghrelin receptors. Therefore, in this study we investigated whether ghrelin and GHS-R1a of the paraventricular hypothalamus contribute cardiac contractility and chronotropy.

2- MATERIAL AND METHODS

Animals and surgery

Local animal facility (Bioterio Central) provided adult male Wistar rats (250-350 g) after experimental procedures being approved by Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of Goiás (Brazil) (CEUA-UFG protocol 090/15). Our procedures also in according with rules established by Brazilian Committee for Animal Experiment (COBEA) and by U.S. National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. All efforts were made to minimize the number of animals needed to complete the experiments.

Experiments were conducted under urethane anesthesia (1.4 g/kg i.p.); its adequacy was verified by the absence of a withdrawal response to a nociceptive stimulation of a hindpaw. Supplemental doses of urethane were given when necessary. Polyethylene catheters were placed into the femoral artery and vein for recordings arterial pressure (AP) and for drug injections, respectively. Left ventricular pressure (LVP) was measured using polyethylene catheter inserted into the left ventricle through the right common carotid artery (Amplifier AVS Projetos AECAD 02P - Brazil). Peak values of the first derivative from LVP, i.e. $LVdP/dt$ peak (a measure of

contractility), were computed online. Subsequently, the animals were positioned on a heating pad in a prone position, and their head was placed in a stereotaxic frame (AVS Projetos – Brazil), in ventral decubitus with the head positioned -3.3mm above the interaural line. The skull was exposed in the midline for visualization of Bregma. The location coordinates of PVH were: anteroposterior: -1.8 mm; dorso-ventral: -7.8 to -8.0mm; and lateral: 0.7mm. After performing a local craniotomy, which allowed for needles insertion into rat brain, an ultra-fine tipped glass micropipette was directed to the PVH and drugs were injected. The volume for all drugs, including the Evans Blue dye, was 100 nl. Body temperature was monitored using rectal thermometer and maintained in the range of 37-37.5°C with a heating pad.

Experimental design

Animals were anesthetized and instrumented for cardiovascular recordings and central injections as described above. After waiting about 20 minutes for stabilization of cardiovascular parameters, injections of drugs into PVH were performed unilaterally. The experiments were divided into the following experimental groups (n = 5 – 6 each; please see figure captions for details).

Experiment 1 – Cardiac responses produced by injection of ghrelin into PVH

After surgeries, it was waited a minimum period of 20 minutes for stabilization of cardiovascular parameters. Subsequently, injection (100 nL) of ghrelin (0.03 nM) was made in PVH. 20 min period was waited to observe the responses evoked by ghrelin. The amplitudes of the responses evoked by ghrelin were compared to baseline values.

Experiment 2 – Cardiac responses produced by the antagonism of GHSR-1a receptors (injection of PF04628935) into PVH

After surgeries, it was waited a minimum period of 20 minutes for stabilization of cardiovascular parameters. Subsequently, injection (100 nL) of PF04628935 (0.06 nM) was made in PVH. 20 min period was waited to observe the responses evoked by PF04628935. The amplitudes of the responses evoked by ghrelin were compared to baseline values.

Experiment 3– Cardiac responses produced by the ghrelin following stimulation of GABAA receptors in the PVH

After surgeries, it was waited a minimum period of 20 minutes for stabilization of cardiovascular parameters. Subsequently, injection (100 nL) of the antagonist of GABA subtype A receptors Muscimol (20 mM) was made in PVH. 10 minutes later, it was performed an injection of ghrelin (0.03 nM). 20 min period was waited to observe the responses evoked by injections. The amplitudes of the responses evoked by ghrelin were compared with baseline and between injections into PVH.

Histology

At the end of experiments, the animals received microinjection of Evans blue dye (100nl) in PVH. The brains were removed, kept in paraformaldehyde (10%) and then transferred to 30% sucrose solution for 48 hours prior to further cut (40µm) in cryostat. For histological analysis, sections were mounted on slides previously gelatinized and stained with neutral red. The injection sites were compared with the atlas of Paxinos and Watson [23].

Data acquisition and analysis

Data were acquired using PowerLab 8/35 and LabChart 7.0 (ADInstruments, Sydney, Australia) and displayed online. Statistics were performed using GraphPad Prism 6. Comparisons between responses evoked by microinjections into PVH were determined by student *t*-test. Significance was taken at $P < 0.05$. Data are expressed as mean $\pm$ SE.

3- RESULTS

Experiment 1 – Cardiac responses produced by injection of ghrelin into PVH

Injection of ghrelin into paraventricular hypothalamus reduced arterial pressure (Δ MAP: 40 ± 12 mmHg; $P < 0.05$ vs. baseline), ventricular pressure (Δ LVP max: -28 ± 12 mmHg; $P < 0.05$ vs. baseline) and its derivative (Δ LVdP/dt max: -2051 ± 946 mmHg/s; $P < 0.05$ vs. baseline), without provoking significant changes in cardiac chronotropism (Δ HR: -6 ± 14 bpm; $P > 0.05$ vs. baseline) (Figure 1). Photomicrography exemplifying injection site into PVH is also showed in the figure 1 (Panel I).

Experiment 2 – Cardiac responses produced by the antagonism of GHSR-1a receptors (injection of PF04628935) into PVH

Converse to found after injection of ghrelin, the antagonism of GHS-R1a in the paraventricular hypothalamus after microinjecting PF04628935 evoked systemic (Δ MAP: 8 ± 3 mmHg; $P < 0.05$ vs. baseline) and cardiac pressor responses (Δ LVP max: 29 ± 8 mmHg/s; $P < 0.05$ vs. baseline), besides provoking positive chronotropy (Δ HR: 29 ± 12 bpm; $P < 0.05$ vs. baseline) and inotropy (Δ LVdP/dt max: 1449 ± 467 mmHg/s; $P < 0.05$ vs. baseline) (Figure 2).

Experiment 3– Cardiac responses produced by the ghrelin following stimulation of GABA_A receptors in the PVH

The injection of muscimol reduced cardiovascular parameters. The subsequent injection of ghrelin during activation of GABA_A receptors amplified the magnitude of the reductions in arterial pressure (Δ MAP: -19 ± 5 mmHg; $P < 0.05$ vs. Muscimol) without altering cardiac pressure (Δ LVP max: -14 ± 12 mmHg/s; $P > 0.05$ vs. Muscimol) and contractility (Δ LVdP/dt max: -1744 ± 1286 mmHg/s; $P > 0.05$ vs. Muscimol). Intriguingly, injection of ghrelin during activation of GABA_A receptors increased cardiac chronotropy (Δ HR: 27 ± 12 bpm; $P < 0.05$ vs. Muscimol) (Figure 3).

Summary of results

	GHRELIN	PF04628935	MUSCIMOL	GHRELIN AFTER MUSCIMOL
MAP	↓	↑	↓	↓
HR	---	↑	---	↑
LVP max	↓	↑	↓	---
LVdP/dt max	↓	↑	---	---

Table 1. Summary of the results presented in all experimental groups and the effects on MAP (mean arterial pressure), HR (heart rate), LVP max (maximal left ventricular pressure), LVdP/dt max (maximal derivative from left ventricular pressure) caused by injection of ghrelin (n=7), PF04628935 (n=6) and muscimol followed by ghrelin (n=5).

↑ Increase, ↓ Decrease, --- non-significant change.

4- DISCUSSION

The main findings of this study were: i) Injection of ghrelin into PVH reduced arterial pressure and contractility without affecting in cardiac inotropy; ii) The blockade of endogenous ghrelin by the antagonism of GHS-R1a of the PVH increased pressure, heart rate e cardiac contractility; iii) Ghrelin potentiated the hypotensive effects evoked from stimulation of GABAA receptors of the PVH.

From the discovery of ghrelin, described in the seminal studies of Kojima [24, 25], to the present, it is becoming undoubted that the pleiotropic features of ghrelin go far beyond a simple role in the control of metabolism and energetic balance. Even being predominantly produced by the oxyntic cells of the stomach, ghrelin is known for controlling several functions [26] and for interfering with several tissues, including brain areas and their neurotransmitters [27, 28]. This, in turn, arises an important integrative role played by ghrelin, which is strongly supported by studies that demonstrated the presence of the GHS-R1a in several organs [29, 30]. In this regard, it is not unlike to propose that the hypothalamic ghrelin – GHS-R1a axis would be an interesting target to investigate the interference of this peptide in the autonomic control of some systems, such as the cardiovascular.

In situ hybridization studies detected the mRNA for ghrelin in hypothalamic nuclei, brain stem, substantia nigra and ventral tegmental area [27]. Although ghrelin – GHS-R1a axis modulates centrally organized functions [31], it is still quite controversial whether ghrelin is actively generated from neurons [28]. The expression of ghrelin in the hippocampal neurons was assessed by Russo and colleagues. Their findings revealed that neurons producing ghrelin in the hippocampus project monosynaptically to amygdala and arcuate nucleus [32, 33]. GHS-R1a is broadly distributed in the central nervous system [34, 35], which includes the hypothalamus and specifically, the subdivisions of the PVH [36]. These receptors are also found in the hippocampus, subfornical organ, area postrema, dorsal vagus nucleus, ventral tegmental area and nucleus tract solitarius [10, 31]. It was also approached the role of ghrelin in

the hippocampus and suggested that the learning processes are involved in the food seeking and intake behaviors [37, 38]. The injection of ghrelin in the arcuate nucleus provoked increases in food intake and in the breathing coefficient [39]. The complexity of approaching the role of hormones that might regulate several functions becomes more interesting with the discovery of synergic actions exerted by orexinergetic peptides (such as neuropeptide Y and Agouti related peptide) and anorexinergetic peptides (such as proopiomelanocortin and leptin) [9, 10, 40].

It has been suggested that some neurotransmitters, as noradrenalin, may modulate the tonic influence of GABA over the activity of sympathetic premotor neurons of PVH [41, 42], which is corroborated by the findings of Daftary and colleagues [43]. Intrahypothalamic glutamatergic inputs also contributes to the modulation of the responses evoked by noradrenalin [44]. Increases in glutamatergic release upon PVH govern the release of vasopressin and oxytocin [45]. Therefore, the balance between excitatory and inhibitory neurotransmitters determines the control of homeostasis in different systems, such as cardiovascular. The group of neurons we focused is responsive to gabaergic inputs, which arises the possibility that an interaction between GABA and ghrelin would reflect in cardiovascular responses. The study of Cruz and colleagues provided some support to the aforementioned hypothesis, as they investigated the neural pathways underlying the consumption of alcohol, an agonist of GABA_A receptors. In the presence of ghrelin, there were increases in the number of inhibitory post synaptic potentials. These inhibitory potentials were increased during the simultaneous influences of ghrelin and alcohol, which clearly suggests that ghrelin is able to amplify the inhibitory influences of GABA and/or the activity of GABA_A receptors [46, 47]. From electrophysiological approaches, the assessments of ghrelin influence upon amygdala regions revealed an important role of this hormone in the organization of food intake and emotional components linked to anxiety and stress [48]. Carlini and co-workers evaluated the administration of ghrelin and the role of extrahypothalamic regions, such as

1
2
3 amygdala and raphe nuclei. They reported a role for ghrelin in the responses of food intake,
4
5 memory formation and anxiety-like behavior [32, 49]. Therefore, there are consistent evidences
6
7 on involvement of ghrelin in the organization of several functions as well as its interaction with
8
9 neural pathways controlled by GABA.

10
11 Injections of ghrelin in the nucleus tract solitarius evoked significant increases in
12
13 arterial pressure and heart rate, which was concomitant to increases in the activity of renal
14
15 sympathetic nerves. While pharmacological ganglionic blockade reverted these changes, the
16
17 muscarinic antagonism by atropine did not produce any effect. Jointly, these results confirmed
18
19 the involvement of the sympathetic branch in the cardiovascular responses evoked by ghrelin.
20
21 Furthermore, injections of ghrelin in the area postrema caudal and rostral ventrolateral medulla
22
23 were not able to produce changes in arterial pressure and heart rate, whereas same injections
24
25 into NTS modified sympathetic activity and pressor responses [50, 51]. Recently, we
26
27 demonstrated that ghrelin-GHS-R1a axis potentiated that tachycardia evoked by acute stress
28
29 exposure and the mechanisms involved strongly relies on sympathetic and beta-adrenergic
30
31 paths [52]. In the current study, ghrelin, the antagonist of GHS-R1a and the agonist of GABA_A
32
33 receptors were injected into the PVH in order to assess the contribution of ghrelin and its
34
35 receptors and a possible involvement of GABA_A receptors to the effects evoked by ghrelin. In
36
37 the light of the evidences on the important role of gabaergic synapses to the control of
38
39 hypothalamic functions [46, 47, 53], we hypothesize that ghrelin may change the amplitude of
40
41 GABA influences on PVH neurons. Gabaergic tone upon PVH is responsible for controlling
42
43 the activity of these hypothalamic sympathetic premotor neurons [6, 54, 55]. It is possible that
44
45 ghrelin and GHS-R1a would affect the gabaergic influences upon PVH neurons. Present data
46
47 showed that injection of muscimol into PVH potentiated the hypotensive effects caused by
48
49 injection of ghrelin into PVH, without affecting cardiac contractile function. This points
50
51 towards a predominance of vasomotor components controlled by PVH when cardiovascular
52
53
54
55
56

parameters are at baseline or lower levels. Interestingly, the responses to the antagonism of GHS-R1a were converse to those evoked by injection of ghrelin in the PVH. It suggests that the endogenous ghrelin is playing a role in reducing the activity of sympathetic premotor neurons of PVH. This suggestion shall to be supported by the study of Cabral and colleagues. They reported that the gastric emptying, an autonomically controlled function, is mediated by that action of circulating ghrelin upon gabaergic neurons of area postrema [28].

The reductions in arterial pressure when ghrelin was injected following activation of GABA_A receptors in the PVH may be related to the previous evidence on the effects of ghrelin during the effect of GABA_A agonism by alcohol, which reported a modulation on the inhibitory post synaptic potentials [46]. The tachycardia that occurred simultaneously to the hypotension cited above seem to be result of baroreflex predominance. In, fact the projections of PVH from and to brainstem areas [49] composing medullary circuit of the baroreflex [11, 56] may be influenced by the effects of both GABA and ghrelin-GHS-R1a manipulations. This is another evidence that the stimulation of GHS-R1a and its receptors may interfere with the sensitivity of gabaergic synapses in the PVH. The changes in the neurochemistry and in the levels of hormones, whose release is governed by PVH, may modify baroreflex function [5, 55, 57]. Stimulation of PVH further confirms the contribution of this area to the adjustments of cardiovascular function [1, 58]. Matsumara and colleagues reported a sympathoinhibition following administration of ghrelin, which was concomitant to pressure reductions and attenuation of baroreflex function in conscious rats [14]. This strongly suggests the involvement of vasomotor components and of baroreflex pathways, which meets the previous reports of PVH contribution to the control of baroreflex function [8, 59]. The projections of PVH to NTS [10] and to the sympathetic premotor neurons of RVLM [60, 61], likely known for governing vasomotion and for composing medullary baroreflex pathways, provides

additional support to the recent findings. However, the influence of ghrelin on every synaptic relay of baroreflex circuitry still need to be systematically assessed.

PVH neurons may change blood pressure levels, either by reaching directly the spinal intermediolateral column – where the sympathetic efferences are conducted – or by projecting to the sympathetic medullary neurons of RVLM [14, 59]. Therefore, it is not unlike to suppose that neurons coordinating cardiovascular functions, where GHS-R1a are densely expressed, may be influenced by ghrelin. In fact, the inhibition of PVH neurons results in reduction in the activity of sympathetic nerves [42]. This reflects in adjustments of arterial pressure, renal function, respiratory activity and heart function [11, 62]. For example, PVH neurons are responsible for the sympathetic over activity to the heart during heart failure. This may be consequence of modifications in the inhibitory inputs over PVH neurons, which would allow for a predominance of excitatory stimuli within this hypothalamic area [62, 63]. In the light of these evidences, the involvement of central ghrelin – GHS-R1a axis in pathophysiology of some cardiovascular diseases seems plausible.

The recent study of Gaston and co-workers demonstrated that an anxiogenic doses of ghrelin interferes with hypothalamic-pituitary-adrenal axis, which is mediated by activity of GABA_A receptors [41, 42, 64]. The patterns of adrenocorticotrophin, a hallmark of neuroendocrine responses to stress, was assessed in humans infused with ghrelin. It was found that ghrelin induces secretion of adrenocorticotrophin that depends on arginine-vasopressin responses [65]. Since ghrelin release is a neuroendocrine effect of acute stress exposure [44, 52] and the injection of ghrelin induced activation of several stress-related brain areas [10], we recently assessed the role of ghrelin – GHS-R1a axis in the cardiovascular responses evoked by acute emotional stress exposure. During stress, ghrelin potentiates cardiac reactivity to stress by modulating sympathetic control and beta-adrenergic sensitivity. In the presence of ghrelin, isolated hearts increased heart function and there was an increase in calcium transient of cardiomyocytes [52]. Our current findings

1
2 demonstrate that ghrelin injection in the PVH reduced blood pressure and contractility, without
3
4 modifying chronotropy. It is possible that central effects of ghrelin depend on the potentiation of
5
6 gabaergic inhibitory mechanisms whereas in peripheral tissues, such as in cardiac cells, it is able to
7
8 potentiate beta-adrenergic mechanisms [66].
9
10

11 GHSR1a was described as the main receptor through which ghrelin reaches its
12
13 integrative effects upon multiple systems [16, 40]. The several questions that still remain to be
14
15 answered with regard to physiological multisystem role of ghrelin drive the steps for further
16
17 studies [10, 35]. The present study shows that ghrelin – GHS-R1a in the PVH contributes to the
18
19 control of cardiac function and arterial pressure. These effects seem to be result of interactions
20
21 with gabaergic neurotransmission. However, further studies are necessary to better understand
22
23 electrophysiological and molecular mechanisms involved in the effects of ghrelin in neurons,
24
25 especially those composing sympathetic premotor groups.
26
27
28
29
30
31
32
33
34

35 **SUPPORT**

36
37 Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Universal CNPq
38
39 473536/2013-7). Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG DocFix 04/2014).
40
41 Michelle Mendonça and Kellen Cruz were recipient of a master fellowship from Coordenação de
42
43 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Joice Simões Santana was recipient of
44
45 a master fellowship from FAPEG.
46
47
48
49
50
51

52 **CONFLICTS OF INTEREST:** none
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Review Only

5- REFERENCES

1. Coote, J.H., *Cardiovascular function of the paraventricular nucleus of the hypothalamus*. Biol Signals, 1995. **4**(3): p. 142-9.
2. Clarke, I.J., *Hypothalamus as an endocrine organ*. Compr Physiol, 2015. **5**(1): p. 217-53.
3. Dampney, R.A., *Central neural control of the cardiovascular system: current perspectives*. Adv Physiol Educ, 2016. **40**(3): p. 283-96.
4. Coote, J.H., *A role for the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the autonomic control of heart and kidney*. Exp Physiol, 2005. **90**(2): p. 169-73.
5. Reddy, M.K., K.P. Patel, and H.D. Schultz, *Differential role of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in modulating the sympathoexcitatory component of peripheral and central chemoreflexes*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005. **289**(3): p. R789-97.
6. Kenney, M.J., M.L. Weiss, and J.R. Haywood, *The paraventricular nucleus: an important component of the central neurocircuitry regulating sympathetic nerve outflow*. Acta Physiol Scand, 2003. **177**(1): p. 7-15.
7. May, C.N., et al., *Specific control of sympathetic nerve activity to the mammalian heart and kidney*. Exp Physiol, 2010. **95**(1): p. 34-40.
8. Pyner, S., *Neurochemistry of the paraventricular nucleus of the hypothalamus: implications for cardiovascular regulation*. J Chem Neuroanat, 2009. **38**(3): p. 197-208.
9. Mani, B.K., et al., *The role of ghrelin-responsive mediobasal hypothalamic neurons in mediating feeding responses to fasting*. Mol Metab, 2017. **6**(8): p. 882-896.
10. Andrews, Z.B., *The extra-hypothalamic actions of ghrelin on neuronal function*. Trends Neurosci, 2011. **34**(1): p. 31-40.
11. Schreihofer, A.M. and P.G. Guyenet, *The baroreflex and beyond: control of sympathetic vasomotor tone by GABAergic neurons in the ventrolateral medulla*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2002. **29**(5-6): p. 514-21.
12. Bali, B. and K.J. Kovacs, *GABAergic control of neuropeptide gene expression in parvocellular neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus*. Eur J Neurosci, 2003. **18**(6): p. 1518-26.
13. Nagaya, N., et al., *Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2001. **280**(5): p. R1483-7.
14. Matsumura, K., et al., *Central ghrelin modulates sympathetic activity in conscious rabbits*. Hypertension, 2002. **40**(5): p. 694-9.

15. Vlasova, M.A., K. Jarvinen, and K.H. Herzig, *Cardiovascular effects of ghrelin antagonist in conscious rats*. Regul Pept, 2009. **156**(1-3): p. 72-6.
16. Edwards, A. and A. Abizaid, *Clarifying the Ghrelin System's Ability to Regulate Feeding Behaviours Despite Enigmatic Spatial Separation of the GHSR and Its Endogenous Ligand*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(4).
17. Suzuki, H. and Y. Sugiyama, *[Kinetic analysis of the disposition of hydrophilic drugs in the central nervous system (CNS): prediction of the CNS disposition from the transport properties in the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers]*. Yakugaku Zasshi, 1994. **114**(12): p. 950-71.
18. Scott, V., D.M. McDade, and S.M. Luckman, *Rapid changes in the sensitivity of arcuate nucleus neurons to central ghrelin in relation to feeding status*. Physiol Behav, 2007. **90**(1): p. 180-5.
19. Wang, Y., et al., *Extrinsic ghrelin in the paraventricular nucleus increases small intestinal motility in rats by activating central growth hormone secretagogue and enteric cholinergic receptors*. Peptides, 2015. **74**: p. 43-9.
20. Shafton, A.D., A. Ryan, and E. Badoer, *Neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus send collaterals to the spinal cord and to the rostral ventrolateral medulla in the rat*. Brain Res, 1998. **801**(1-2): p. 239-43.
21. Haywood, J.R., et al., *gamma-Aminobutyric acid (GABA)--A function and binding in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in chronic renal-wrap hypertension*. Hypertension, 2001. **37**(2 Pt 2): p. 614-8.
22. Martin, D.S., T. Segura, and J.R. Haywood, *Cardiovascular responses to bicuculline in the paraventricular nucleus of the rat*. Hypertension, 1991. **18**(1): p. 48-55.
23. Paxinos, G. and C. Watson, *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 2nd ed, ed. A. Press. 1986, New York.
24. Kojima, M., et al., *Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach*. Nature, 1999. **402**(6762): p. 656-60.
25. Kojima, M., *The discovery of ghrelin--a personal memory*. Regul Pept, 2008. **145**(1-3): p. 2-6.
26. Kojima, M. and K. Kangawa, *Ghrelin: structure and function*. Physiol Rev, 2005. **85**(2): p. 495-522.
27. Zigman, J.M., et al., *Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain*. J Comp Neurol, 2006. **494**(3): p. 528-48.

28. Cabral, A., et al., *Circulating Ghrelin Acts on GABA Neurons of the Area Postrema and Mediates Gastric Emptying in Male Mice*. *Endocrinology*, 2017. **158**(5): p. 1436-1449.
29. Kojima, M., H. Hosoda, and K. Kangawa, *Purification and distribution of ghrelin: the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor*. *Horm Res*, 2001. **56 Suppl 1**: p. 93-7.
30. Wang, G., et al., *Ghrelin--not just another stomach hormone*. *Regul Pept*, 2002. **105**(2): p. 75-81.
31. Mason, B.L., Q. Wang, and J.M. Zigman, *The central nervous system sites mediating the orexigenic actions of ghrelin*. *Annu Rev Physiol*, 2014. **76**: p. 519-33.
32. Carlini, V.P., et al., *Differential role of the hippocampus, amygdala, and dorsal raphe nucleus in regulating feeding, memory, and anxiety-like behavioral responses to ghrelin*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **313**(3): p. 635-41.
33. Russo, C., et al., *Hippocampal Ghrelin-positive neurons directly project to arcuate hypothalamic and medial amygdaloid nuclei. Could they modulate food-intake?* *Neurosci Lett*, 2017. **653**: p. 126-131.
34. Bowers, C.Y., *History to the discovery of ghrelin*. *Methods Enzymol*, 2012. **514**: p. 3-32.
35. Ghigo, E., et al., *Ghrelin: more than a new frontier in neuroendocrinology*. *J Endocrinol Invest*, 2004. **27**(6 Suppl): p. 101-4.
36. Olszewski, P.K., et al., *Hypothalamic paraventricular injections of ghrelin: effect on feeding and c-Fos immunoreactivity*. *Peptides*, 2003. **24**(6): p. 919-23.
37. Petrovich, G.D. and M. Gallagher, *Control of food consumption by learned cues: a forebrain-hypothalamic network*. *Physiol Behav*, 2007. **91**(4): p. 397-403.
38. Kanoski, S.E. and H.J. Grill, *Hippocampus Contributions to Food Intake Control: Mnemonic, Neuroanatomical, and Endocrine Mechanisms*. *Biol Psychiatry*, 2017. **81**(9): p. 748-756.
39. Currie, P.J., et al., *Ghrelin is an orexigenic and metabolic signaling peptide in the arcuate and paraventricular nuclei*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005. **289**(2): p. R353-R358.
40. Howick, K., et al., *From Belly to Brain: Targeting the Ghrelin Receptor in Appetite and Food Intake Regulation*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(2).
41. Decavel, C. and A.N. Van den Pol, *GABA: a dominant neurotransmitter in the hypothalamus*. *J Comp Neurol*, 1990. **302**(4): p. 1019-37.

42. Han, S.K., et al., *Noradrenaline excites and inhibits GABAergic transmission in parvocellular neurons of rat hypothalamic paraventricular nucleus*. J Neurophysiol, 2002. **87**(5): p. 2287-96.
43. Daftary, S.S., C. Boudaba, and J.G. Tasker, *Noradrenergic regulation of parvocellular neurons in the rat hypothalamic paraventricular nucleus*. Neuroscience, 2000. **96**(4): p. 743-51.
44. Scopinho, A.A., et al., *Non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in the paraventricular nucleus of hypothalamus mediate the pressor response evoked by noradrenaline microinjected into the lateral septal area in rats*. J Neurosci Res, 2008. **86**(14): p. 3203-11.
45. Busnardo, C., R.F. Tavares, and F.M. Correa, *Role of N-methyl-D-aspartate and non-N-methyl-D-aspartate receptors in the cardiovascular effects of L-glutamate microinjection into the hypothalamic paraventricular nucleus of unanesthetized rats*. J Neurosci Res, 2009. **87**(9): p. 2066-77.
46. Cruz, M.T., et al., *Ghrelin increases GABAergic transmission and interacts with ethanol actions in the rat central nucleus of the amygdala*. Neuropsychopharmacology, 2013. **38**(2): p. 364-75.
47. Hashiguchi, H., et al., *Direct versus indirect actions of ghrelin on hypothalamic NPY neurons*. PLoS One, 2017. **12**(9): p. e0184261.
48. Alvarez-Crespo, M., et al., *The amygdala as a neurobiological target for ghrelin in rats: neuroanatomical, electrophysiological and behavioral evidence*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e46321.
49. Geerling, J.C., et al., *Paraventricular hypothalamic nucleus: axonal projections to the brainstem*. J Comp Neurol, 2010. **518**(9): p. 1460-99.
50. Lin, Y., et al., *Ghrelin acts at the nucleus of the solitary tract to decrease arterial pressure in rats*. Hypertension, 2004. **43**(5): p. 977-82.
51. Mao, Y., T. Tokudome, and I. Kishimoto, *Ghrelin and Blood Pressure Regulation*. Curr Hypertens Rep, 2016. **18**(2): p. 15.
52. Camargo-Silva, G., *Ghrelin potentiates cardiac reactivity to stress by modulating sympathetic control and beta-adrenergic sensitivity*. LIFE SCIENCE, 2018.
53. Delgado, T.C., *Glutamate and GABA in Appetite Regulation*. Front Endocrinol (Lausanne), 2013. **4**: p. 103.
54. Li, Y.F., et al., *Interaction between glutamate and GABA systems in the integration of sympathetic outflow by the paraventricular nucleus of the hypothalamus*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(6): p. H2847-56.

55. Kc, P. and T.E. Dick, *Modulation of cardiorespiratory function mediated by the paraventricular nucleus*. Respir Physiol Neurobiol, 2010. **174**(1-2): p. 55-64.
56. Guyenet, P.G., *The sympathetic control of blood pressure*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(5): p. 335-46.
57. Patel, K.P. and P.G. Schmid, *Role of paraventricular nucleus (PVH) in baroreflex-mediated changes in lumbar sympathetic nerve activity and heart rate*. J Auton Nerv Syst, 1988. **22**(3): p. 211-9.
58. Duan, Y.F., et al., *Cardiorespiratory components of defense reaction elicited from paraventricular nucleus*. Physiol Behav, 1997. **61**(2): p. 325-30.
59. Aicher, S.A., et al., *Anatomical substrates for baroreflex sympathoinhibition in the rat*. Brain Res Bull, 2000. **51**(2): p. 107-10.
60. Jeske, I., et al., *Identification of baroreceptor reflex interneurons in the caudal ventrolateral medulla*. Am J Physiol, 1993. **264**(1 Pt 2): p. R169-78.
61. Morrison, S.F. and D.J. Reis, *Responses of sympathetic preganglionic neurons to rostral ventrolateral medullary stimulation*. Am J Physiol, 1991. **261**(5 Pt 2): p. R1247-56.
62. Sved, A.F., et al., *Excitatory inputs to the RVLM in the context of the baroreceptor reflex*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **940**: p. 247-58.
63. Li, Y.F. and K.P. Patel, *Paraventricular nucleus of the hypothalamus and elevated sympathetic activity in heart failure: the altered inhibitory mechanisms*. Acta Physiol Scand, 2003. **177**(1): p. 17-26.
64. Gaston, M.S., M.P. Cid, and N.A. Salvatierra, *Bicuculline, a GABAA-receptor antagonist, blocked HPA axis activation induced by ghrelin under an acute stress*. Behav Brain Res, 2017. **320**: p. 464-472.
65. Coiro, V., et al., *Adrenocorticotropin/cortisol and arginine-vasopressin secretory patterns in response to ghrelin in normal men*. Neuroendocrinology, 2005. **81**(2): p. 103-6.
66. Camargo-Silva, G., et al., *Ghrelin potentiates cardiac reactivity to stress by modulating sympathetic control and beta-adrenergic response*. Life Sci, 2018.

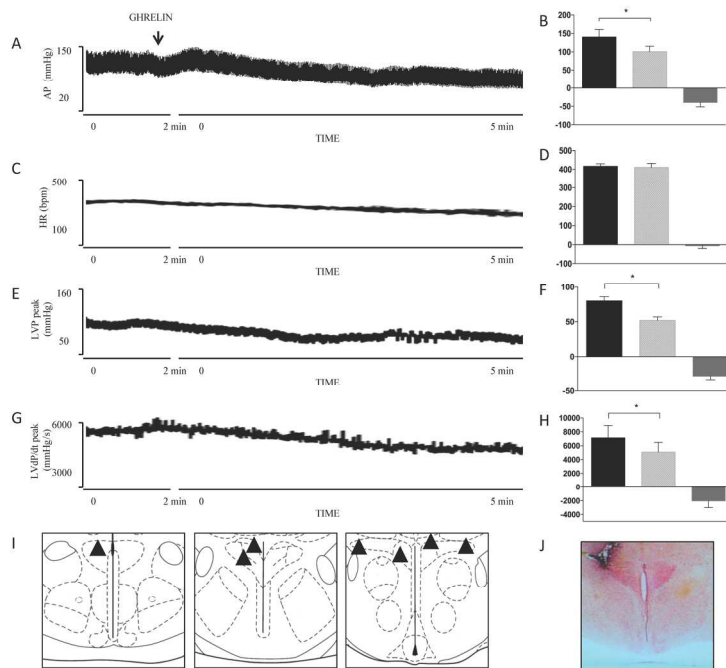


Figure 1. Chart records illustrating the responses of AP (panel A), HR (panel C), LVP peak (panel E) and LVdP/dt peak (panel G) produced by the unilateral microinjection (arrows at the top indicate the moment of injection) of ghrelin into PVH. Right column - Mean maximal changes in MAP (panel B), HR (panel D), LVP peak (panel F) and LVdP/dt peak (panel H) in response to unilateral microinjections of ghrelin (100nl). Values referring to the means collected at the basal period (2 minutes before the central injection), and at the maximum point of response to microinjection of ghrelin and its variation. * P < 0.05. MAP, mean arterial pressure; HR, heart rate; LVP peak, maximum pressure in the left ventricle; LVdP/dt peak, first derivative of cardiac left ventricle pressure. Panel (I) at the bottom is a schematic representation of the injection sites and panel J shows a slice with neutral red depicting the spot stained by Evans blue dye from an animal injected with ghrelin (100nl) into PVH. n=7.

209x148mm (300 x 300 DPI)

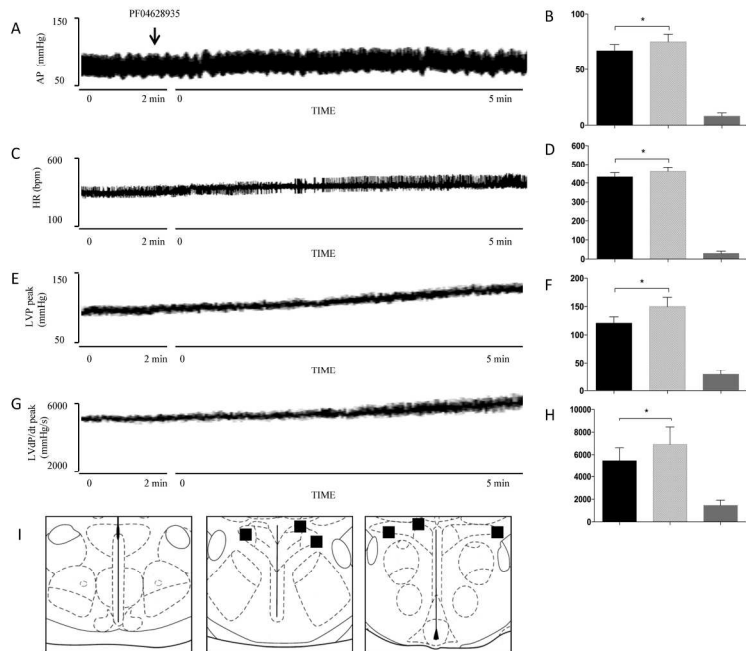


Figure 2. Chart records illustrating the responses of AP (panel A), HR (panel C), LVP peak (panel E) and LVdP/dt peak (panel G) produced by the unilateral microinjection (arrows indicate the moment of injection) of PF04628935 in PVH. Right column - Mean maximal changes in MAP (panel B), HR (panel D), LVP peak (panel F) and LVdP/dt peak (panel H) in response to unilateral microinjections of PF04628935 (100nl). Values referring to the means collected in the basal period (2 minutes before the central injection), and at the maximum point of response to microinjection of PF04628935 and its variation. * $P < 0.05$. MAP, mean arterial pressure; HR, heart rate; LVP peak, maximum pressure in the left ventricle; LVdP/dt peak, first derivative of cardiac left ventricle pressure. Bottom panel (I) - Schematic representation of the injection sites from the group injected with PF04628935 (100nl) into PVH. $n=6$

209x148mm (300 x 300 DPI)

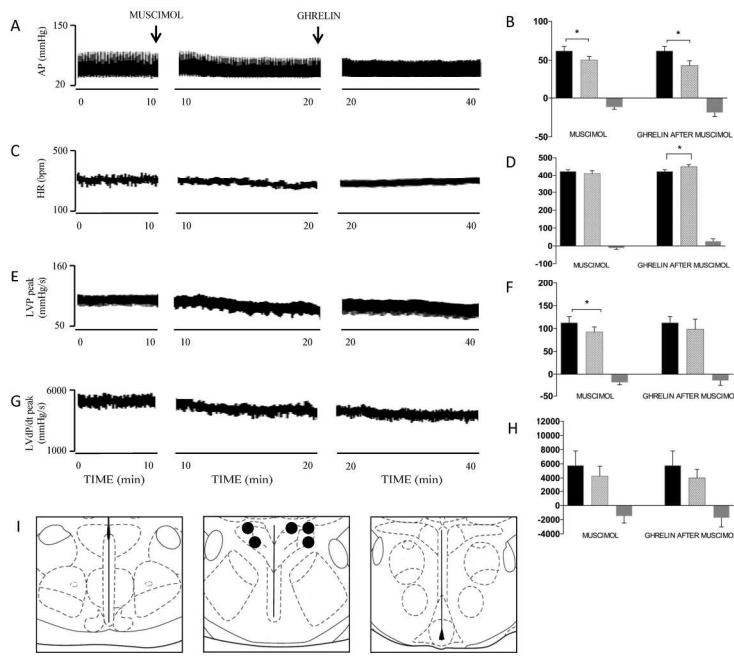


Figure 3. Left column - Chart records illustrating the responses of AP (panel A), HR (panel C), LVP peak (panel E) and LVdP/dt peak (panel G) produced by the unilateral microinjection (arrows indicate the moment of injection) of muscimol and ghrelin into PVH. Right column - Mean maximal changes in MAP (panel B), HR (panel D), LVP peak (panel F) and LVdP/dt peak (panel H) in response to unilateral microinjections of muscimol and ghrelin (100nl). Values referring to the means collected in the basal period (2 minutes before the central injection), and at the maximum point of response to microinjection of muscimol and injection of ghrelin and its variation. * P < 0.05. MAP, mean arterial pressure; HR, heart rate; LVP peak, maximum pressure in the left ventricle; LVdP/dt peak, first derivative of cardiac left ventricle pressure. Bottom panel (I) - Schematic representation of the injection sites from the group injected with muscimol and ghrelin (100nl) group into PVH. n=5

209x148mm (300 x 300 DPI)